

**IMPLICAÇÕES IMUNOBIOLOGICAS DA INFECÇÃO A
HERPESVIRUS EM TUMORES MALIGNOS**

**Pesquisa e Análise Quantitativa de Herpesvirus
Humanos no Astrocitoma Pilocítico**

Ana Margarida Sameiro Moutinho Neves

Lisboa 2008

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa

**IMPLICAÇÕES IMUNOBIOLOGICAS DA INFECÇÃO A
HERPESVIRUS EM TUMORES MALIGNOS**

**Pesquisa e Análise Quantitativa de Herpesvirus
Humanos no Astrocitoma Pilocítico**

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, na Área de Imunologia,
apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova
de Lisboa

Orientadores:

Professor Doutor Machado Caetano

Professor Doutor Rueff Tavares

Ana Margarida Sameiro Moutinho Neves

Lisboa 2008

Aos meus Pais

Aos meus Filhos

À minha Neta

ÍNDICE

LISTA DE PUBLICAÇÕES	13
LISTA DE ABREVIATURAS	15
AGRADECIMENTOS	17
PREFÁCIO	19
RESUMO	23
ABSTRACT	25
RÉSUMÉ	27
CAPÍTULO I	29
I. INTRODUÇÃO	31
I.1. A PROBLEMÁTICA DOS AGENTES INFECCIOSOS LATENTES	31
I.2. RESUMO HISTÓRICO	41
I.3. EVOLUÇÃO FILOGENÉTICA	44
I.4. HERPESVIRUS	47
I.4.1. <i>HSV1 e 2</i>	48
I.4.2. <i>VZV</i>	50
I.4.3. <i>EBV</i>	52
I.4.4. <i>CMV</i>	62
I.4.5. <i>HHV6</i>	64
I.4.6. <i>HHV7</i>	65
I.4.7. <i>HHV8</i>	66
I.5. TUMORES CEREBRAIS	68
I.5.1. <i>Tumores Infantis</i>	68
I.5.2. <i>Tumores do SNC</i>	68
I.6. MECANISMOS DE ONCOGÉNESE	72
I.7. ONCOGÉNESE VIRAL	80

CAPÍTULO II	83
II. OBJECTIVOS	85
II.1. OBJECTIVOS	85
II.2. MAPA CONCEPTUAL	86
CAPÍTULO III	87
III. MATERIAL E MÉTODOS	89
III.1. GRUPOS DE DOENTES	89
III.2. PROCEDIMENTOS	91
III.2.1. <i>Técnica e Equipamentos Utilizados</i>	91
III.2.2. <i>Análise Estatística</i>	96
CAPÍTULO IV	97
IV. RESULTADOS	99
IV.1. RESULTADOS	99
IV.1.1. <i>Cargas Virais dos Herpesvirus</i>	99
IV.1.2. <i>PCR CODEHOP</i>	102
IV.1.3. <i>Imunohistoquímica</i>	103
IV.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS	104
IV.2.1. <i>Cargas Virais dos Herpesvirus</i>	104
IV.2.2. <i>Comparação entre os Grupos</i>	106
CAPÍTULO V	109
V. DISCUSSÃO	111
V.1. QUAL É O VERDADEIRO SIGNIFICADO DA PRESENÇA DE HERPESVIRUS NOS ASTROCITOMAS? E NO CEREBELO?	111
V.2. A QUE CRITÉRIOS OBEDECE A EVENTUAL ATRIBUIÇÃO DE CAUSALIDADE ONCOGÉNICA?	117
V.3. EXISTIRÃO AGENTES INFECCIOSOS AINDA NÃO DESCOBERTOS?	120
V.4. PORQUE EXISTE UMA TÃO GRANDE VARIABILIDADE NOS RESULTADOS DE DIFERENTES ESTUDOS?	122
CAPÍTULO VI	127
VI. CONCLUSÕES	129
APÊNDICE	133
ARTIGOS	135
ANÁLISE ESTATÍSTICA	154

APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA	197
INFORMAÇÃO PARA O DOENTE/ CONSENTIMENTO	
INFORMADO	199
BIBLIOGRAFIA	201

ÍNDICE TABELAS

TABELA 1 – VÍRUS E LINFOMAS (adaptado de Pagano, 2002)	37
TABELA 2 – EXPRESSÃO DOS GENES LATENTES DO EBV NA DOENÇA (Cohen, 2000)	56
TABELA 3 - SUBTIPOS HETEROGÊNEOS DE CÉLULAS T REGULADORAS E RESPECTIVOS MARCADORES (adaptado de Romagnani, 2006)	57
TABELA 4 – PROTEÍNAS DO EBV MODULADORAS DA RESPOSTA IMUNE E DA APOPTOSE (Tsellis e Jenson, 2006)	60
TABELA 5 – SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES (<i>PRIMERS</i>) E SONDAS (<i>PROBES</i>) PARA DETECÇÃO DA DNA POLIMERASE DO HHV1, HHV2 E VZV	92
TABELA 6 – SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES (<i>PRIMERS</i>) E SONDAS (<i>PROBES</i>) PARA DETECÇÃO DA DNA POLIMERASE DO EBV, HHV8, CMV, HHV7, HHV6 A E B	93
TABELA 7 – CARGAS VIRAIS DE HERPESVÍRUS DETECTADOS EM TECIDO NORMAL DO CEREBELO E NOS ASTROCITOMAS	101
TABELA 8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS 1 (<20 ANOS) E 2 (≥ 20 ANOS)	107

ÍNDICE FIGURAS

FIGURA 1 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS HERPESVÍRUS HUMANOS E SÍMIOS, POR ANÁLISE DO ALINHAMENTO DOS AMINOÁCIDOS DA DNA POLIMERASE (adaptado de Rose et al., 1997)	44
FIGURA 2 - O VÍRUS HERPES SIMPLEX EM MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (com permissão de Wikipedia)	48
FIGURA 3 - DIAGRAMA SIMPLIFICADO DA REPLICAÇÃO LÍTICA DO HSV (adaptado de Graham Colm, 2008)	49
FIGURA 4 - IMAGEM DE ENCEFALITE (com permissão de Marina, 2008)	50
FIGURA 5 - IMAGEM DE 2 VIRIÕES EBV POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA VISUALIZANDO-SE A CÁPSIDE E O	

	MATERIAL GENÉTICO ENVOLVIDO POR PROTEÍNA (adaptado com permissão de Liza Gross, 2006)	52
FIGURA 6 -	LIGAÇÃO DO EBV À MEMBRANA CELULAR (EBV “KISS”) (adaptado de Borza e Hutt Fletcher, 2002)	53
FIGURA 7 -	VISÃO INTEGRADA DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DE RESPOSTA A UM ANTIGÊNIO. AS CÉLULAS CD4+ T <i>HELPER</i> (EG. TH1, TH2 E T REGULADORAS) ESTIMULADAS APÓS A ENTRADA DO ANTIGÊNIO VIRAL, SÃO CRUCIAIS NESTE PROCESSO ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE DIVERSAS CITOQUINAS. AS T REGULADORES PODEM INIBIR AMBAS AS VIAS TH1 E TH2, ATRAVÉS DA IL10 E DO TGF β , EM PARTICULAR A VIA TH1, LEVANDO À PRODUÇÃO PREFERENCIAL DE IGG E IG A PELOS LINFÓCITOS B (adaptado de Moingeon et al., 2006)	58
FIGURA 8 -	ASTROCITOMA PILOCÍTICO (Adaptado com permissão de Jeffrey Bruce, 2006)	71
FIGURA 9 -	DIAGRAMA DA CÉLULA EM APOPTOSE (adaptado com permissão de Emma Farmer, 2006)	75
FIGURA 10 -	ACTIVAÇÃO DA APOPTOSE PELO FAS LIGANDO (adaptado com permissão de Emma Farmer 2006)	76
FIGURA 11 -	CICLO CELULAR	81
FIGURA 12 -	MAPA CONCEPTUAL. AS INFECÇÕES POR HHV QUE OCORREM FREQUENTEMENTE NA INFÂNCIA, PODERIAM, POR HIPÓTESE, ESTAR IMPLICADAS, AO LONGO DO PERÍODO DE LATÊNCIA, EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E/OU TUMORAIS	86

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	HERPESVIRUS IDENTIFICADOS NOS ASTROCITOMAS	104
GRÁFICO 2 -	HERPESVIRUS PRESENTES NOS CONTROLOS	105
GRÁFICO 3 -	PREVALÊNCIA RELATIVA NOS CONTROLOS E NOS TUMORES	105

LISTA DE PUBLICAÇÕES

O trabalho experimental apresentado nesta tese foi realizado nos Departamentos de Imunologia e Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa e no Laboratório do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Cornell, Ithaca, NY, EUA

Foi bolsista da Fundação Gulbenkian e da Fundação Luso-Americana.

O presente trabalho contém técnicas e/ou dados experimentais apresentados também nos seguintes artigos científicos:

Hermouet S, Sutton C, Rose T, Murcek R, Corre I, Garrand R, **Neves AM**, Bataille R, Casey JW. (2003) *Qualitative and quantitative analysis of Human Herpesvirus in chronic and acute B-cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma*. Leukemia 17: 185-95.

Neves AM, Thompson G, Carvalheira J, Costa Trindade J, Rueff J, Caetano JM, Casey JW, Hermouet S. (2008) *Detection and quantitative analysis of Human Herpesvirus in pylocytic astrocytoma*. Brain Research 1221: 108-114.

Neves AM, Pereira A, Trindade JC, Pinto JR, Rueff J, Caetano JM, Hermouet S, Mege JL. *The Epstein-Barr virus, the IL-10, the switch TH1-TH2 and the regulatory T cells*. Manuscript in preparation.

Castro (Neves) AM, Vassal H, Cabeçadas J, Melo I, Figueiredo T, Melo Gomes J, Trindade JC. (1997) *A case of Castleman disease* (abstract). Proceedings of the AAACI (San Francisco). Journal of Allergy and Clinical Immunology 99; 1; 2: S23.

Castro (Neves) AM, Mege JL, Mata PL, Pinto JR, Caetano JM. (1998) *Anti-inflammatory role of cytokines in Epstein-Barr virus infection* (abstract). Proceedings of the III International Congress on Pediatric Pulmonology, Monaco.

Neves AM, Hermouet S, Rueff J, Caetano JM, Thompson G, Casey JW. (2005) *Immunobiological mechanisms induced by DNA virus* (abstract) Proceedings of the V Rencontre Scientifique du Cembreu, Briançon.

LISTA DE ABREVIATURAS

BKV- Poliomavirus BK
CNF- Carcinoma da Nasofaringe
CODEHOP-PCR- *Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers*
CSF- Factor Estimulador de Colónias
CTL- Linfócito T Citotóxico
DH- Doença de Hodgkin
DLP- Doença Linfoproliferativa
EBER- RNA Codificado do Vírus de Epstein-Barr
EBNA- Antígeno Nuclear do Vírus de Epstein-Barr
EBV- Vírus de Epstein-Barr
HHV- Herpesvirus Humanos
HHV 6 e 7- Herpesvirus Humano 6 e 7
HSV1 e 2- Vírus Herpes Simplex 1 e 2
HHV8 ou KSHV- Herpesvirus Humano 8 ou Vírus do Sarcoma de Kaposi
HIV- Vírus de Imunodeficiência Humana
HTLV- *Human T-cell Leukemia Virus*
IFN- Interferão
IL- Interleucina
JCV- Poliomavirus JC
LB- Linfoma de Burkitt
LMP- Proteína Latente de Membrana
LT- Linfoma de Células T
MHC- Complexo Major de Histocompatibilidade
MNI- Mononucleose Infecciosa
NK- *Natural Killer Cell*

SI- Sistema Imunológico
SV40- *Simian Vacuolating 40 Virus*
Rt qPCR- *Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction*
SNC- Sistema Nervoso Central
SIDA- Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SK- Sarcoma de Kaposi
TH- Célula T Auxiliadora
TIL- *T Infiltrating Lymphocytes*
TGF- *Transforming Growth Factor*
TNF- Fator de Necrose Tumoral
Treg- Célula T Reguladora
VZV- Vírus Varicela Zoster
X-DLP- Doença Linfoproliferativa Ligado ao Cromossoma X

AGRADECIMENTOS

Na elaboração escrita desta dissertação, a descrição pormenorizada de conceitos e trabalho fornece apenas a vertente científica, embora nada revele quanto à importância da vertente humana que o acompanhou e tornou possível.

Correndo embora o risco de ser mal interpretada ou de cometer alguma injustiça é este o momento de realçar a importância do apoio que lhe foi dado.

Ao Professor Doutor Machado Caetano, com quem iniciou os primeiros passos na Imunologia e na Medicina, agradeço a sua amizade, conselhos e orientação.

Ao Professor Doutor Rueff Tavares que teve papel preponderante na sua formação e no seu interesse pelas áreas de Bioquímica, Genética e Biologia Molecular agradeço a sua orientação, estímulo e apoio.

À Professora Doutora Gertrude Thompson que acreditou em mim e me encorajou a efectuar o meu estágio em Cornell.

Aos Professores James Casey e Professora Sylvie Hermouet, meus orientadores nos Estados Unidos, que acreditaram no meu projecto e o desenvolveram.

À Cientista Rufina Casey que me encorajou tão calorosamente e cozinhou as delícias de chocolate para os TGIF (*Thanks God It's Friday*).

Ao Dr. Pita Groz, meu Mestre em Infecçiology.

Ao Professor Doutor Costa Trindade, o meu respeito, não só pela invulgar capacidade científica mas também pelas suas qualidades humanas e espírito de justiça.

Ao Professor Doutor Gomes Pedro, Dr.^a Paulina Santos, Virgílio Nereu, Rocha Paulo, sucessivos directores do Serviço de Pediatria, agradeço a amizade, estímulo e empenho no meu percurso e no sucesso deste trabalho.

Aos Professores Pimentel, Carlos Lima, Bigotte, Melo Pires, Diogo Pais e Manuela Mafra, por me terem facultado as amostras anatomo-patológicas.

À Dr.^a Ana Serpa e Professora Rosário Sanches que me auxiliaram na extracção do DNA.

À Fundação Gulbenkian e Fundação Luso Americana, pelas bolsas concedidas.

À Gilda Mira Godinho Monteiro (Merck Sharp and Dhome) e Álvaro Nunes (Schering e Alodial) – pelo seu generoso mecenato.

Ao Dr. Pedro Lima (Merck Sharp and Dhome) agradeço o apoio no tratamento gráfico do manuscrito.

À Equipa Médica, de Enfermagem, Técnica e Administrativa do Serviço de Pediatria, agradeço a amizade dedicada e leal.

A todos os meus Mestres em Medicina e Pediatria, que me abriram as portas deste Mundo Maravilhoso do Conhecimento da Natureza Humana.

A todos os meus Colegas, nomeadamente à Dr.^a Isabel Rodrigues, com quem tive o privilégio de trabalhar, partilhar experiências, alegrias e tristezas e receber ensinamentos.

A todos os meus Amigos, em particular à Dr.^a Natália, D. Isilda e à Isabel, Ana Marques e Doris, pela amizade incondicional.

Ao Filipe que me fez entender a “Insustentável Leveza do Ser”.

Por fim à minha Família, pela rede de amor, ternura e apoio que tornou todo este projecto viável e lhe deu sentido.

Ao meu querido Pai que faleceu durante a fase inicial deste projecto, penso que ele iria ficar muito orgulhoso.

PREFÁCIO

A elaboração de um trabalho desta natureza representou um momento de reflexão.

Em primeiro lugar, o fascínio pela patogénese e clínica das doenças infecciosas e a sua íntima relação com a imunidade e bioquímica, em segundo lugar, a minha experiência clínica, algumas vezes, tão inesperadamente dramática e em terceiro lugar, a convicção que deposito no método científico como instrumento para a compreensão e resolução dos problemas, levou-me à ideia de investigar os Herpesvirus.

Esta família de vírus DNA, os Herpesviridae, sempre me despertou uma profunda curiosidade. O misterioso carácter de latência e oportunismo imunológico, a interferência em múltiplos mecanismos fisiopatológicos, o imprevisível e assustador potencial oncogénico permitem considerá-los como autênticos “bio-terroristas” moleculares. Alguém os definiu, com muita propriedade, como: *“a piece of bad news wrapped in protein”*

Desde o 1º Ano do Curso de Medicina que a Bioquímica, dando asas à minha imaginação, me proporcionava autênticas viagens ao centro do mundo molecular, com todas as suas vias metabólicas e fenómenos fisiopatológicos...

Na altura, recorrendo à fantasia prodigiosa dos contos de fada, tão presente na minha infância, imaginava a DNA polimerase dos Vírus, qual vassoura animada do Aprendiz de Feiticeiro, carregando baldes

de DNA, de forma incessante e desastrosa e escapando ao controle do Grande Feiticeiro que era a Célula.

A Genética, com a decifração progressiva do DNA pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*), ia fornecendo os instrumentos básicos que actualmente permitem desvendar memórias recentes e ancestrais das diferentes Espécies e do Homem, abrindo as portas da Biologia Molecular de par em par.

Em estágio realizado no serviço de Imunologia do Professor Griscelli, em Paris, apercebi-me da gravidade que as infecções virais assumiam, particularmente por vírus DNA latentes, em situações de deficiência imunitária de vária natureza, causando desde quadros linfoproliferativos de difícil controle até infecções graves do Sistema Nervoso Central (SNC), pulmonares, renais, gastrointestinais, cardíacas. Em crianças aparentemente normais e, por causas que escapavam à nossa compreensão, assisti também esporadicamente a quadros inesperados e incontroláveis de generalização de viroses, de depressão imunitária secundária ou a processos de malignização de desenlace fatal.

As fronteiras entre a Bioquímica, Imunologia, Biologia Molecular e a Medicina Clínica são claramente artificiais, sendo necessária uma abordagem multidisciplinar para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes aos problemas clínicos com que nos debatemos no nosso quotidiano. Os vírus efectuam uma verdadeira translação através destas Ciências.

No estágio em Cornell, tratando-se de um Laboratório de Investigação Básica de elevadíssimo nível, foi possível estabelecer uma frutuosa ponte entre estes mundos.

Recentemente foi publicado, no *New England Journal of Medicine* pela equipa com quem colaborei em Cornell e no seguimento desse trabalho, um artigo em que era realçada a importância do envolvimento viral em patologia tumoral, o que representa uma viragem conceptual importante nesta área.

A contribuição para um melhor entendimento das infecções virais latentes foi o grande objectivo do meu trabalho.

“*Da avidéz do conhecimento*” (Alberoni) resultou a vontade de pesquisar ideias dando eventualmente um humilde acréscimo à sua compreensão.

RESUMO

As infecções virais podem contribuir para o desenvolvimento do cancro, estando vários tumores malignos associados aos Herpesvirus (HHV). O vírus de Epstein-Barr (EBV) e o Herpesvirus 8, dois γ Herpesvirus, foram reconhecidos como agentes etiológicos de várias neoplasias.

O astrocitoma pilocítico do cerebelo é um dos tumores cerebrais mais frequentes na criança, adolescentes e jovens adultos e a proliferação astrocitária ocorre geralmente após vários tipos de agressão, nomeadamente a infecção viral. Para investigar esta eventual interligação, estudámos 35 astrocitomas pilocíticos, pesquisando a presença dos 8 Herpesvirus. Neste estudo, foram utilizadas 10 amostras de biópsias do cerebelo de doentes que faleceram por doenças não relacionadas com infecção ou patologia tumoral. A maioria dos astrocitomas (33) eram tumores de baixa malignidade.

As amostras foram analisadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real (qPCR), com amplificação do gene da DNA polimerase viral. Treze astrocitomas e 7 controles revelaram pequenas quantidades de DNA viral (1-100 cópias/100ng DNA) de todos os Herpesvirus, com excepção do HHV6 A e B que estava ausente nas amostras. O EBV foi identificado em 9 dos 35 astrocitomas (26%) e em 7 dos 10 controles (70%) estando muito mais presente nos controles. As amostras positivas para o EBV foram também analisadas por imunohistoquímica, não tendo sido imuno-reactivas para os anticorpos utilizados.

A PCR com CODEHOP (*consensus-degenerated hybrid oligonucleotide primers*) foi utilizada para investigar a presença de um eventual Herpesvirus novo nestas amostras. Não foi identificada nenhuma sequência indicativa de um novo HHV por este método.

Em conclusão, os dados apontam para a presença de Herpesvirus, com particular relevância para o EBV, em tecido de cerebelo normal e em tumores cerebrais, embora em níveis demasiado baixos para poderem ser responsabilizados pela indução tumoral.

A presença de sequências de DNA de Herpesvirus, nomeadamente do EBV, no Sistema Nervoso Central vem enriquecer a discussão sobre o significado da infecção viral na oncogénese humana, particularmente na neuro-oncogénese.

ABSTRACT

Viral infections can contribute to the development of human cancer. Several human malignancies are linked with Human Herpesviruses (HHVs). Epstein-Barr virus and HHV8, two γ Herpesvirus, have been recognized as etiologic agents of several neoplasms.

Pilocytic astrocytoma of the cerebellum is one of the most common brain tumour in children, adolescents and young adults and astrocytary proliferation generally occurs after several types of injury, namely viral infection. To further explore this association, we have searched the tissue from 35 pilocytic astrocytoma, for all the 8 HHV. In this study, ten brain biopsies (cerebellum) from patients who died of unrelated diseases were used as controls. Most of the astrocytomas (33) were of low grade malignity.

Samples were assessed by Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (q PCR) amplification of viral DNA polymerase gene. Thirteen astrocytoma and 7 controls showed low viral DNA levels (1-100 copies/100ng DNA) for all HHVs, with the exception of HHV6 that was absent.

EBV was identified in 9 of the 35 astrocytoma (26 %) and in 7 of the 10 controls (70%) being more present in controls. EBV positive samples were also assessed by Immunohistochemistry (IHC) but none showed immunoreactivity for the antibodies used.

PCR with consensus-degenerated hybrid oligonucleotide primers (CODEHOP) were also used to look for novel HHVs in these samples and no sequence indicative of a new HHV was detected.

Altogether the data indicate the presence of HHVs, with relevance for EBV in normal cerebellum tissue and also in brain tumours but at too low levels to be considered responsible for tumour induction.

The presence of HHV DNA sequences, particularly EBV, in the studied brain tumours and control samples, further enriches the discussion about the relevance of viral infection in human oncogenesis, particularly neuro-oncogenesis.

RÉSUMÉ

Les infections virales peuvent contribuer au développement du cancer. Les virus de type Herpès sont associés à plusieurs néoplasies. Il est par exemple établi que les virus Epstein-Barr et « human Herpesvirus 8 » (HHV-8) sont responsables de plusieurs tumeurs malignes.

L'astrocytome pilocytique du cervelet est l'une des tumeurs les plus fréquentes chez les enfants, adolescents et adultes jeunes. En général la prolifération des astrocytes se produit en réponse à une agression. Posant l'hypothèse d'une agression d'origine virale, nous avons recherché la présence des 8 virus Herpès dans les tissus de 35 astrocytomes. Dans cette étude, 10 échantillons de biopsie de cervelet de patients décédés suite à d'autres pathologies, ont été utilisés comme contrôles. La majorité des astrocytomes étaient de très basse malignité.

Les échantillons ont été étudiés par PCR quantitative en temps réel, en amplifiant le gène de l'ADN-polymérase virale. Treize astrocytomes sur 35 (37%) et 7 contrôles sur 10 (70%) ont été trouvés positifs pour tous les HHV sauf l'HHV6, toujours avec un nombre de copies de polymérase virale bas (< 100 copies/100 ng d'ADN). Notamment l'EBV a été identifié 7 fois dans les contrôles (70%) et 9 fois dans les astrocytomes (26%).

Les échantillons positifs pour l'EBV ont aussi été étudiés par immuno-histochimie. Aucun signal n'a été observé avec les anticorps utilisés.

Enfin, une technique de PCR avec oligonucléotides dégénérés (CODEHOP ou *consensus degenerated hybrid oligonucleotide primers*) a été utilisée pour rechercher la présence d'un éventuel nouveau virus Herpès dans les échantillons d'astrocytome. Aucun nouveau virus n'a été identifié.

En résumé, nous avons établi la présence de virus Herpès, en particulier l'EBV, dans le cervelet normal et dans les tumeurs du cerveau. Les quantités d'ADN viral retrouvées sont faibles et ne permettent pas d'attribuer à ces virus la responsabilité de l'induction des tumeurs. Cependant, la présence d'ADN de virus Herpès dans le cerveau sain ou pathologique vient enrichir la discussion sur le signification de l'infection virale dans les processus d'oncogenèse en général, et dans la neuroonco-genèse en particulier.

CAPÍTULO I

I. INTRODUÇÃO

I.1. A PROBLEMÁTICA DOS AGENTES INFECCIOSOS LATENTES

Os **Vírus** surgiram há cerca de 3 biliões de anos. Parecem ter tido origem em material nucleico que se autonomizou, a partir de organismos celulares (Drexler, 2002).

As infecções que provocam, podem ser extremamente variadas, desde as infecções respiratórias, gastrointestinais, hepáticas, cardíacas, neurológicas, hematológicas e sistémicas, com repercussões também muito variáveis, quer biológicas, quer sócio-epidemiológicas (Gern e Busse, 1995; Hegele et al., 1995; Martinez et al., 1995). Embora sejam frequentemente auto limitadas e de gravidade ligeira, podem por vezes ser verdadeiramente devastadoras (Marques et al., 1993; Campbell, 1995; Castro, 1996).

Os vírus causadores de infecção e doença no ser humano podem ser classificados globalmente em três grupos, com base no seu comportamento epidemiológico.

Os membros do primeiro grupo são agentes como o vírus do sarampo, o vírus da poliomielite e o vírus da hepatite A- agentes patogénicos humanos ancestrais, que se transmitem por ondas epidémicas. Eles não persistem após a infecção. A susceptibilidade das populações humanas está relacionada com a preexistência de imunidade ao vírus.

O segundo grupo consiste em vírus que chegaram directa ou indirectamente aos seres humanos a partir de um reservatório animal. O SARS coronavírus (*Severe Acute Respiratory Syndrome*), o HIV, o vírus Ébola são exemplos recentes. A doença humana induzida por

estes agentes é um exemplo de virulência inter-espécies. Como não houve qualquer contacto anterior, os seres humanos são extremamente susceptíveis a doença de mortalidade muito elevada causada por este tipo de vírus.

O terceiro grupo, ao qual pertencem os Herpesvirus, corresponde ao grupo de vírus que estabelece persistência para toda a vida após a infecção. A infecção é praticamente universal. Estes vírus co-evoluíram há milhões de anos com o ser humano e os seus primatas ancestrais. Quer o ser humano quer os próprios vírus desenvolveram estratégias intrincadas para manterem esta coexistência, como veremos adiante (Drexler, 2002).

Os vírus DNA e os Retrovírus, com o seu misterioso carácter de latência e imprevisibilidade, evoluíram no sentido de utilizar as defesas do hospedeiro, os genes e proteínas do sistema imunológico, de forma a estabelecerem uma infecção persistente para toda a vida, numa relação de complexa interdependência (Casanova, 1997; Becher, 2002; Trgovcich et al., 2002).

A interferência nas vias metabólicas celulares, nomeadamente a replicação do DNA, a síntese de proteínas e a fosforilação oxidativa, é fulcral para a sua própria existência (Kurzrock, 1999; Cohen 1995, 1997, 2000).

A grande diferença entre pequenos vírus, com um pequeno número de genes, podendo ser extraordinariamente destrutivos, como é o caso do vírus Ébola que tem apenas 7 genes, e estes grandes vírus DNA, como os Herpesvirus (100 a 200 genes), é que estes últimos conseguem estabelecer um equilíbrio imunobiológico mais ou menos estável com o hospedeiro, assegurando assim a sua própria sobrevivência, com uma elevadíssima taxa de infecciosidade (quase 100% da população).

A persistência crónica de um microrganismo exige assim uma estratégia diferente da infecção aguda que é em regra mais destrutiva e portanto mais facilmente identificável pelo nosso sistema imunológico (Gaur et al., 1994).

Os vírus que causam persistência críptica não destroem as células, pelo contrário replicam-se lentamente em células muito diferenciadas como por exemplo os neurónios ou as células B de memória. Estas células aparentam uma quase normalidade e um equilíbrio que por vezes se rompe, dando origem a doença ou oncogénese (Damania, 2007; Oliveira, 2007).

O hospedeiro deve assim, em última instância, manter a sua mobilidade e contactos, de forma a poder ser mais infeccioso e transmitir a doença ao maior número possível de contactos. Segundo alguns geneticistas, a “*raison d’être*” de qualquer microrganismo é passar eficazmente os seus genes (Drexler, 2002).

Começa agora a tomar forma, a ideia de que esta convivência ancestral poderá eventualmente, trazer algum benefício para o hospedeiro.

No entanto, e esta é uma das perguntas cruciais em relação a este tipo de vírus, como, quando e porquê, o equilíbrio nesta inter-relação entre vírus e hospedeiro se rompe? Envolvimento de cofactores ambientais (eg. malária e EBV), nomeadamente do ambiente profissional (Medeiros et al., 2003)? Idade da primoinfecção? Factores genéticos (Gaspar et al., 2004)? Mutações génicas (Rueff et al., 2002)? Imunodeficiência congénita ou adquirida? Todos os anteriores associados?

É esta agressão múltipla, por vezes distanciada no tempo, que pode tornar difícil a identificação do agente viral inicial.

Há cerca de um século que procuramos agentes infecciosos como causa directa de **doenças agudas**.

Robert Koch, no final do século XIX, deu origem, com as suas pesquisas, aos seguintes postulados:

- 1º- o microrganismo deve estar presente nos tecidos patológicos.
- 2º- o microrganismos tem de ser isolado e cultivado em cultura pura.

- 3º- o microrganismo deve provocar a mesma doença quando injectado a um animal saudável.
- 4º- o microrganismo determina um aumento significativo de anticorpos específicos.

Estes postulados funcionam perfeitamente quando os microrganismos são fáceis de cultivar e transmitir e quando os sintomas explodem rapidamente após a infecção aguda.

Contudo muitos vírus e algumas bactérias não são cultiváveis, nem têm infecção equivalente em animal experimental (Moghadan et al., 1997) e finalmente o agente da infecção original pode ter “saído de cena”, quando a doença se manifesta.

Será que se poderia acrescentar que uma doença é infecciosa se curar quando o microrganismo for eliminado? E se se tratar de uma infecção latente?

Não será esta visão, apenas metade do quadro?

Será que as bactérias e os vírus poderão causar doença de forma mais subtil? Será que os chamados comensais saprófitas nos poderão ocasionalmente trair?

Como é que nós convivemos com todos estes microrganismos dentro de nós?

A Natureza, ao longo de milhões de anos, providenciou um equilíbrio que em qualquer momento pode sofrer ruptura.

Na **doença crónica**, a ligação a agentes infecciosos pode não ser directa nem evidente e o mecanismo de muitas doenças crónicas permanece ainda desconhecido.

A grande dificuldade é conseguir provar a causalidade e não a mera presença do agente infeccioso que pode corresponder apenas a um inocente espectador. A ubiquidade de alguns destes microrganismos, nomeadamente dos Herpesvirus, com elevadas taxas de seroconversão tornam difícil estabelecer uma associação etiológica e epidemiológica.

No entanto, com o aumento progressivo da resolução de novas técnicas, nomeadamente de biologia molecular, será possível identificar os agentes mais crípticos, sendo urgente pesquisar infecções eventualmente causadoras destas doenças crónicas (Wang e Sugden, 2004).

Nos últimos anos, um número crescente de doenças foram sendo sucessivamente relacionadas com agentes infecciosos bacterianos e virais. As associações mais reconhecidas são as seguintes:

O *Helicobacter pylori* provoca úlceras pépticas e está relacionado com o adenocarcinoma gástrico e o linfoma gástrico MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*). Barry Marshal para comprovar a causalidade, ingeriu, ele próprio, o *Helicobacter pylori*, provocando a úlcera péptica.

O *Schistosoma* provoca o cancro da bexiga (*Schistosoma haematobium*) e o cancro do cólon (*Schistosoma Mansoni*).

Foi recentemente descrito um tipo de perturbação obsessiva-compulsiva aguda denominada de PANDAS (*Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infection*) que é provocada pelo *Streptococcus A*.

O papilomavírus (subtipos 16-18) causa 90% dos cancros do colo do útero sendo os genes E6 e E7 responsáveis pela imortalização das células (Crum, 2002), com a particularidade de já não ser possível detectar o vírus nas fases finais do tumor (*hit and run*) (Huang et al., 2004). A sua integração no DNA, nos denominados “*hot spots*”, provoca ainda importantes deleções cromossómicas. A vacina contra este vírus abre uma nova era na abordagem do cancro (Zur Hausen, 2000).

Os vírus da hepatite B e C causam 60% dos carcinomas hepatocelulares quando associados a outros factores oncogénicos (*multi-step, multi-hit*). O vírus da Hepatite C foi recentemente associado ao linfoma de células B (Hermine et al., 2002) e à leucemia plasmocitária, em associação com o HHV8 (Hermouet et al. 2003). A forma como se integram no DNA celular, em pontos ao acaso, pode

provocar deleções e rearranjos cromossômicos, que como veremos adiante, podem estar na origem do processo oncogénico.

O HTLV-1 (*Human T-cell Leukemia Virus*) causa uma leucemia de células T, endémica no Japão, décadas após a infecção inicial (Matsuoka, 2003).

Ambos os γ Herpesvirus (EBV e HHV8) são comprovadamente oncogénicos (Neves et al., 2005).

O EBV provoca o linfoma de Burkitt, o carcinoma da nasofaringe (Lin et al., 2005), a doença linfoproliferativa post-transplante (Lucas et al., 1996), os linfomas cerebrais primários dos doentes com Sida, a doença de Hodgkin (Ambinder, 2003; Thorley-Lawson e Gross, 2004) e ainda o recentemente descrito leiomiosarcoma em imunodeprimidos (Tselis e Jenson, 2006).

O HHV 8 causa o sarcoma de Kaposi, uma complicação maligna da Sida, estando também na origem do linfoma de efusão primária da cavidade abdominal e da doença de Castleman multicêntrica (Soulier et al., 1995; Wang e Sugden, 2004; Wang et al., 2004).

Os vírus podem assim estar na origem de várias doenças hematológicas nomeadamente dos linfomas como se pode verificar na tabela 1.

A evidência de uma possível causa infecciosa destas doenças era desde há muito suspeitada e provinha em grande parte de dados epidemiológicos (Kinlen e Balkwill, 2001). A maior incidência em comunidades com nível socio-económico mais elevado é um facto (Krieger et al., 2003), podendo tal facto estar relacionado com uma mais tardia exposição e/ou uma resposta imunológica anormal, como pode ocorrer na mononucleose infecciosa na adolescência. A susceptibilidade genética também parece um factor de primordial importância (Mackenzie et al., 2001).

Tabela 1 – Vírus e Linfomas (adaptado de Pagano, 2002).

Vírus/Linfomas	Causa primária	Papel do Vírus	Outros Factores
EBV L. de Burkitt	Activação de C-MYC	cofactor	<i>Plasmodium falciparum</i>
D. Linfo-proliferativa (B)	EBV	Directo	Imunodepressão
Doença de Hodgkin	Desconhecido	Talvez agrave mec. primário	Celularidade mista
Linfoma T	EBV	Desconhecido Inf. rara cél. T	Frequente na Ásia
Linfoma cél. B primário do SNC	EBV	Directo	HIV / Imunodepressão
HHV8 Linfoma efusão primária cél. B	HHV8	Talvez directo	Talvez coopere com o EBV na SIDA
Doença de Castleman (plasmócitos)	HHV8 Hiperplasia policlonal	Talvez directo IL 6 viral	
HTLV-1 Leucemia e Linfoma cél. T	HTLV-1	Directo	Factores genéticos e ambientais
Vírus da Hepatite C Linfoma cél. B	Imunoestimulação das cél. B	Indirecto	Inf. crónica activa

Abreviaturas: Linfoma (L), células (cél), infecção (inf), mecanismo (mec).

De forma geral, os agentes infecciosos associados aos linfomas podem agir de duas maneiras: ou activam os linfócitos directamente através dos seus receptores para antígenos ou, por outro lado, activam as vias metabólicas intra-celulares intrínsecas dos linfócitos. O vírus da Hepatite C parece levar à proliferação das células B duma forma antígeno-específica (Hermine et al., 2002). Pelo contrário o HTLV-1

e o EBV parecem induzir esta proliferação, como parte integrante do ciclo de vida viral (Ambinder, 2003).

Outras doenças como a diabetes mellitus, o cancro da mama, a doença de Crohn, a artrite reumatóide juvenil, a litíase biliar e renal, a prematuridade (Henke-Gendo et al., 2004), a esquizofrenia, a doença de Alzheimer (Hill et al., 2005), a esclerose múltipla e a aterosclerose, parecem poder ter também uma origem infecciosa actualmente em intensa investigação (Osterholm, 2000).

Historicamente a aplicação dos Postulados de Koch-Henle era requerida para estabelecer uma relação de causa-efeito entre um microrganismo e a doença.

Os Postulados foram então reformulados relativamente à definição de um vírus oncogénico (Pagano et al 2004).

Para que um vírus seja considerado oncogénico é necessário que:

- 1º O vírus esteja invariavelmente presente em todas as células tumorais.
- 2º Sejam capazes de imortalizar células em cultura.
- 3º Origem tumores em animais experimentais.
- 4º Exista associação sero-epidemiológica.

O EBV foi o primeiro vírus humano que cumpriu todos estes requisitos, dado o seu elevadíssimo potencial oncogénico.

A forma como estes critérios se vão ajustar à nova era de diagnóstico genético e molecular ainda está por determinar.

Recentemente foram desenvolvidas métodos quantitativos muito sensíveis nomeadamente a PCR quantitativa (qPCR) que permitem detectar com muita acuidade, as eventuais cargas virais.

Decifrar esta relação entre infecção, doença crónica, tumor, torna-se particularmente difícil quando o agente infeccioso permanece no hospedeiro de forma latente, com períodos imprevisíveis de reactivação e até de reinfecção. Este processo não está sequer previsto nem mesmo definido nos Postulados.

Estamos assim numa **terceira era** dos Postulados de Koch- Henle, que têm assim de ser enunciados de forma mais abrangente e de acordo com a natureza destas doenças crónicas.

Os Herpesvirus são responsáveis por infecções que ocorrem predominantemente na infância podendo atingir seroprevalências de 95% da população em geral. São predominantemente neuro e linfotrópicos sendo actualmente detectados com relativa facilidade pela técnica de PCR e cada vez mais implicados em patologia do Sistema Nervoso Central e Periférico (Kleinschmidt-DeMasters e Gilden, 2001). Evoluíram, utilizando múltiplos mecanismos imunobiológicos, o que lhes permite estabelecer uma infecção persistente ao longo da vida, interferindo comprovadamente em processos que interferem com o ciclo celular (replicação do DNA) e que levam à oncogénese (Trgovcich et al., 2002).

O gene da **DNA polimerase viral**, o mais antigo e mantido gene dos Herpesvirus, poderia constituir, entre outros genes candidatos, um dos genes virais potencialmente mais relacionado com a oncogénese.

A natureza infecciosa de cerca de 25 % dos cancros está actualmente bem estabelecida (Kurzrock e Talpaz, 1999; Hermouet et al., 2003).

Os astrocitomas pilocíticos são um dos tumores mais frequentes na criança, adolescentes e jovens adultos tendo em regra bom prognóstico quando ressecados na totalidade. A proliferação astrocitária ocorre em regra como resposta a uma agressão, eventualmente viral (Kumar, 1997; Voute et al., 1998; Kurzrock e Talpaz, 1999).

A susceptibilidade de cada indivíduo, relacionada muito provavelmente com as particularidades individuais quer genéticas quer da resposta imunológica, bem como factores ambientais

poderiam também ser co-factores decisivos neste processo (Roitt, 1994; Révillard, 1995; Rueff et al., 2002; Medeiros et al., 2003; Gaspar et al., 2004).

Neste estudo procurámos reunir os conceitos necessários à compreensão da **infecção por Herpesvirus e suas possíveis implicações imuno-biológicas em tumores malignos**.

Após um breve resumo histórico, é feito um enquadramento filogenético, uma revisão sobre a biologia molecular e epidemiologia dos Herpesvirus, passando então à descrição dos principais tumores cerebrais eventualmente envolvidos. Os actuais mecanismos moleculares de oncogénese são também analisados, muito particularmente, os mecanismos de oncogénese viral.

O objectivo deste trabalho foi pesquisar e quantificar a presença e eventual envolvimento de **HHV e da sua DNA polimerase, na patogénese dos astrocitomas pilocíticos**.

I.2. RESUMO HISTÓRICO

Herpes significa em grego “arrastar-se”. Inicialmente este termo era utilizado na descrição duma variedade de lesões cutâneas, incluindo a clássica úlcera herpética descrita por Hipócrates e Heródoto.

A varicela foi descrita em meados do século XVIII e zoster significa em grego e latim, cinturão. O reconhecimento da relação entre varicela e zoster foi postulado por Von Bokay, em 1888, que verificou que surgiam casos de varicela após contacto com doentes com zona.

A descoberta do vírus de Epstein-Barr (EBV) constitui uma fascinante lenda épica. Há cerca de 40 anos, Denis Burkitt, um cirurgião missionário, nos seus “safaris de tumores” na África Ocidental, individualizou este tipo frequente de linfoma infantil. Por microscopia electrónica, este vírus viria a ser visualizado em células cultivadas a partir de tecido de linfoma de Burkitt, por Epstein, Achong e Barr (Epstein et al., 1964). O facto de uma das técnicas do laboratório de Henle ter adoecido com mononucleose infecciosa quando estudava células do tumor de Burkitt, permitiu observar a reactividade serológica para o EBV (Henle et al., 1968). A seroconversão estava consistentemente associada a esta doença, pelo que ficou estabelecido o EBV, como causa desta longa e misteriosa doença já descrita formalmente desde 1885 (Paul e Bunnell, 1932; Downey e Stasney, 1935; Evans, 1972; Svedmyr e Jondal, 1975;).

O DNA do EBV foi detectado nos tecidos de doentes com carcinoma da nasofaringe em 1970 (Zur Hausen et al., 1970). Em 1975, Purtillo descreveu o síndrome linfoproliferativo ligado ao cromossoma X.

Na década de oitenta, o EBV foi associado a linfomas T não-Hodgkin e à doença linfoproliferativa póstransplante (Baer et al.,

1984). Em doentes com SIDA, foram identificados, como doenças associadas ao EBV, a leucoplaquia oral, linfomas primários do SNC e linfomas B (Greenspan et al., 1985; Gutierrez et al., 1997).

Em 1994, o EBV foi identificado como causa de leiomiosarcomas em imunodeprimidos (Lee et al., 1995).

Admite-se desde 1997 (IARC, 1997), que a doença de Hodgkin possa, com alguma frequência, ser originada pelo EBV (Pallesen et al., 1991, Herbst et al., 1996; Hjalgrim et al., 2003; Timms et al., 2003; Kim et al., 2004). As células gigantes multinucleadas de Reed-Sternberg atestam bem a dualidade da sua natureza. Sternberg acreditava que se tratava da manifestação de uma infecção e Reed acreditava que eram malignas. Actualmente, tornou-se claro que algumas infecções estão intimamente associadas à linfomagenese (Ambinder, 2003).

O CMV não provoca habitualmente sintomas em indivíduos saudáveis, sendo contudo devastador quando há imaturidade ou deficiência do sistema imunológico. Foi descrito por Weller em 1971, como um agente ubiquitário por excelência, sendo transmitido de forma vertical e horizontal (Weller, 1971).

O HHV6 foi isolado pela primeira vez em doentes com doença linfoproliferativa (Salahuddin et al., 1986), sendo mais tarde também isolado em doentes com SIDA. Infecta preferencialmente os linfócitos T. A infecção primária ocorre geralmente na infância, sendo o agente do exantema súbito. Foi reconhecida a consistente seroconversão em 1988 (Clark et al., 1997).

O HHV7 foi isolado em 1990, por Frenkel e colaboradores, a partir de linfócitos T auxiliares de um indivíduo saudável (Frenkel et al., 1990). A infecção primária também ocorre na infância, mas um pouco mais tarde do que a do HHV6, podendo também causar o exantema súbito (Kimberlin et al., 1998).

O HHV8 foi o último Herpesvirus Humano a ser descoberto, em 1994, pela equipa de Ethel Cesarman (Chang et al., 1994; Cesarman et al., 1995; Russo et al., 1996; Cesarman, 2003), também chamado de Herpesvirus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV).

A sua presença em mais de 95% dos tumores de Kaposi fornecia a evidência de estar envolvido na etiologia do mesmo.

Chang e Moore fizeram a primeira grande descoberta utilizando uma técnica inédita - a análise diferencial representativa - que consistia na amplificação selectiva, por PCR, de fragmentos genéticos que apenas surgiam no tecido patológico e não no tecido normal, com exclusão das culturas de células e de tecidos, tendo assim conseguido a identificação do novo vírus (Chang et al., 1994; Moore et al., 1995; Moore et al., 1996; Chuck et al., 1996; Cesarman, 2003).

O seu DNA foi também detectado por hibridação *in situ* nas características células “*spindle-shaped*” do sarcoma de Kaposi e nas células endoteliais que rodeiam as lesões do mesmo.

É o agente causal do sarcoma de Kaposi e do linfoma de efusão primária das cavidades dos doentes com SIDA (Cesarman, 2003), sendo também agente causal dos sarcomas de Kaposi não associados à SIDA (Moore et al., 1995; Dupin et al., 1995; Chuck et al., 1996) e da forma multicêntrica da doença de Castleman (Castro et al., 1995; Soulier et al., 1995; Wang e Sugden, 2004; Wang et al., 2004). Recentemente foi descrita, por Hermouet e colegas (2003), associação deste vírus, à leucémia plasmocitária.

I.3. EVOLUÇÃO FILOGENÉTICA

A passagem de vírus inter-espécies, do mundo animal para o ser humano ocorre. Nalgumas situações trata-se de uma co-evolução ancestral adaptativa como ocorre com os Herpesvirus. Noutros exemplos mais recentes, esta passagem pode ocorrer com a possibilidade de doença devastadora, verdadeiras pandemias, dada a absoluta susceptibilidade do ser humano (*eg.* o vírus da SIDA, o SARS coronavírus, o vírus influenza das aves).

O estudo comparativo das estruturas genéticas dos Herpesvirus nas várias espécies animais permitiu o desenvolvimento de técnicas de PCR que permitem pesquisar a existência de novos Herpesvirus (Rose et al., 1997, 1998; Casey, 1998; Quackenbush et al., 1998), ainda não identificados, sendo particularmente útil naqueles que não crescem em cultura de células.

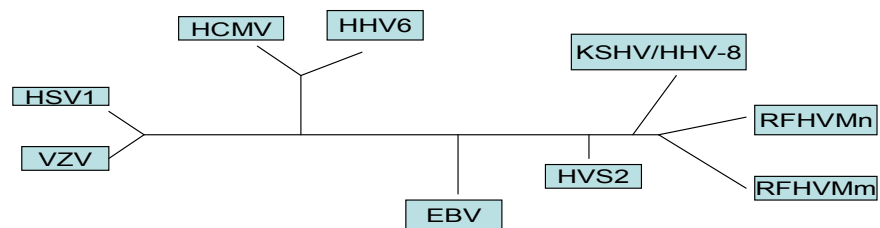


Figura 1 - Árvore Filogenética dos Herpesvirus humanos e símios, por análise do alinhamento dos aminoácidos da DNA polimerase (adaptado de Rose et al., 1997)

Abreviaturas: HVS- Herpesvirus saimiri, RFHVM- Herpesvirus da fibromatose retroperitoneal dos macacos

A análise das sequências de certas regiões dos genomas, nomeadamente da DNA polimerase, dos vários Herpesvirus, de diferentes espécies, demonstraram grandes semelhanças, particu-

larmente entre o HHV8 (KSHV) e o Herpesvirus da fibromatose retroperitoneal dos macacos (RFHVM), e do EBV com o Herpesvirus saimiri dos macacos, sendo todos membros da oncogénica subfamília dos γ Herpesvirus, do género *Rhadinovirus* (Figura 1).

O EBV evoluiu provavelmente de um vírus ancestral de primata não humano e o HHV8 parece também ter tido a mesma origem.

A identificação de 3 Herpesvirus (HHV8, RFHVMn e RFHVMm) diferentes mas muito semelhantes, em diferentes espécies de primatas (*Homo sapiens*, *Macaca nemestrina* e *Macaca mulatta*) implica que estes vírus evoluíram de um vírus ancestral comum, anterior à diferenciação das espécies (Rose et al., 1997).

O paralelismo com o que ocorre no mundo animal deverá assim ser estudado com muita atenção, pois tem-se revelado ser de extrema utilidade.

Em 1909, Rous, que viria a ser galardoado com o prémio Nobel, descobriu o primeiro vírus causador do chamado sarcoma de Rous na galinha.

O primeiro oncogene descrito nos anos setenta, tratava-se de um oncogene de um retrovírus animal.

No mundo animal são frequentes os exemplos claramente comprovados de tumores benignos e malignos provocados por vírus, nomeadamente da família Herpes.

Um novo Herpesvirus, o Herpesvirus bovino linfotrópico (HBL) associado a linfocitose persistente nos bovinos, um novo α -Herpesvirus das tartarugas marinhas associado a fibropapilomatose das mesmas e dois homólogos do HHV8, associados a fibromatose peritoneal de diferentes espécies de macacos, foram identificados utilizando uma técnica particular de PCR que se denomina de CODEHOP (Van Devanter et al., 1996; Rose et al., 1997, 1998; Casey, 1998; Quackenbush et al., 1998).

Trata-se de uma técnica de PCR que utiliza *primers* de oligonucleótidos híbridos degenerados consensualmente. São utilizados em regra *primers* de zonas altamente conservadas nas diversas espécies como certas regiões da DNA polimerase.

A elevada especificidade e sensibilidade deve-se primariamente à utilização de *primers* muito longos contendo uma zona central degenerada e uma zona terminal consensual e a particularidade da reacção decorrer a uma temperatura mais elevada ou com uma elevação progressiva da temperatura.

A semelhança do recém descoberto HHV8, outros Herpesvirus novos e diferentes poderão estar na realidade envolvidos nos tumores humanos.

I.4. HERPESVIRUS.

BIOLOGIA MOLECULAR E EPIDEMIOLOGIA

Os Herpesvirus agrupam-se em 3 subfamílias:

- os *Alphaherpesvirinae* incluem o HSV 1 e 2 e o VVZ (neurotrópicos);
- os *Betaherpesvirinae* incluem o CMV, o HHV 6 e 7 (T linfotrópicos);
- os *Gammapherpesvirinae* incluem o EBV e o KSHV também conhecido como HSV 8 (B linfotrópicos) .

Caracteristicamente estes Vírus podem reactivar-se, ao longo da vida, após a exposição primária e causam um amplo espectro de doenças desde infecção assintomática até infecções fatais.

Estes vírus desenvolveram múltiplos mecanismos de evasão ao Sistema Imunológico. Possuem genes que codificam proteínas que simulam, bloqueiam e interferem intimamente com estes processos. Estas estratégias permitem escapar à fagocitose, ao complemento, às células NK e às células T citotóxicas (CTL).

Este último tipo de resposta parece ser crucial para o controle quer da infecção lítica, quer da infecção latente. Os HHV adoptaram uma plétora de mecanismos para se evadirem da resposta mediada pelo Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC), classe I (*eg* Becher, 2002).

A interferência nos mecanismos MHC, classe II estão menos bem estudados mas o papel das células T auxiliaadoras (TH) parece ser importante na coordenação da resposta imune nestas infecções (Trgovcich et al., 2002).

Parece todavia que apesar de todas as estratégias utilizadas pelos vírus, o Sistema Imunológico conseguiu desenvolver mecanismos que, em condições normais, efectivamente os controlam sem no entanto conseguirem eliminá-los (Roitt, 1994; Révillard, 1995).

I.4.1. HSV1 e 2

Os Herpes Simplex (figura 2) provocam um espectro de doenças desde a gengivo-estomatite, herpes labial, infecção genital, queratoconjuntivite, infecção neonatal, infecções viscerais dos imunocomprometidos até à encefalite herpética.

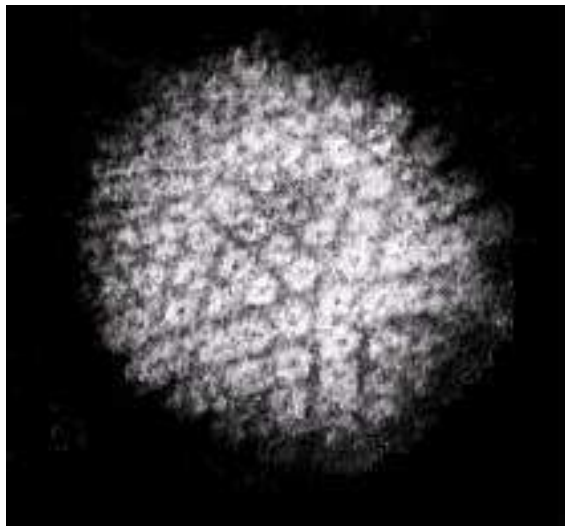


Figura 2 – O Vírus Herpes Simplex em Microscopia electrónica (com permissão de Wikipedia)

Podem ocorrer como infecções primárias (figura 3) ou recorrentes, com reactivação da infecção latente (Davis et al., 2004; Ellerín et al., 2004).

Têm a dupla capacidade de invadir e de se replicar no SNC (neurovirulência) e estabelecer uma infecção latente. Os HSV e o VZV ficam comprovadamente latentes, nos gânglios das raízes nervosas sensoriais.

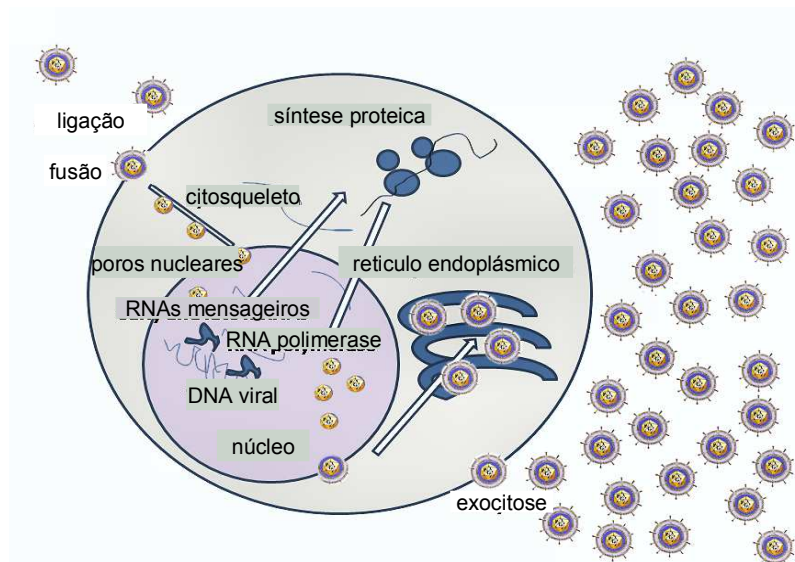


Figura 3 – Diagrama simplificado da replicação lítica do HSV (adaptado de Graham Colm, 2008)

O HSV1 é transmitido geralmente nos primeiros anos de vida, por contacto pessoal próximo, podendo atingir os 80-95% de seroconversão, no final da adolescência, nas populações dos países em desenvolvimento, sendo um pouco mais tardia, nas sociedades com nível socio-económico mais elevado.

A encefalite herpética é a mais devastadora infecção por HSV, atingindo preferencialmente o lobo frontal (vide figura 4), mas podendo atingir virtualmente todas as áreas anatómicas do SNC (meningite, mielite, radiculite e cerebelite entre outras) (Kleinschmidt-DeMasters e Gilden, 2001).

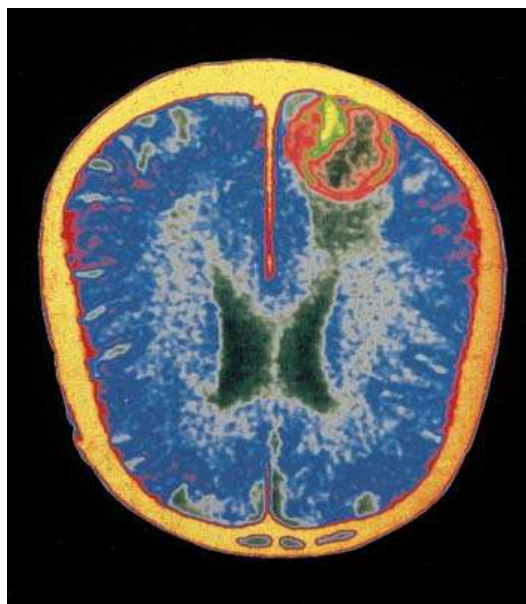


Figura 4 – Imagem de Encefalite (com permissão de Marina, 2008)

Recentemente alguns autores pretendem relacionar as áreas de atingimento cerebral, na Doença de Alzheimer, com a infecção pelo HSV (Hill et al., 2005).

O aciclovir que é um inibidor da DNA polimerase viral, é utilizado no tratamento destas infecções (Davis et al., 2004; Ellerín et al., 2004).

1.4.2. VZV

O VZV ou Herpesvirus 3 é o agente etiológico da varicela e da zona. A zona surge anos após a varicela que é regra geral uma doença infantil aparentemente benigna (Weller, 1983; Marques et al. 1993; Douglas et al., 2003).

O VZV estabelece uma infecção latente nos gânglios nervosos sensoriais. A reactivação ocorre quando existe algum compromisso imunológico e o vírus retorna dos gânglios até à pele, podendo ocorrer no mesmo ou noutra dermatomo. O vírus replica-se no núcleo das células infectadas. Infecta apenas primatas, o que dificultou o seu estudo inicial.

O VZV partilha alguns genes com os HSV sendo também classificado como um α -Herpesvirus (Davison e Scott, 1986).

A varicela é uma das doenças mais contagiosas. A introdução da vacina viva atenuada, aprovada nos EUA desde 1995, irá certamente modificar a sua epidemiologia, embora de forma ainda um pouco imprevisível (Gershon, 1995; Alfaro et al., 2008).

A presença do vírus de forma latente nos gânglios nervosos foi comprovada por PCR e por hibridação *in situ*, tendo sido encontrados no núcleo quer dos neurónios, quer das células satélites. O envolvimento do gânglio e do nervo oftálmico do trigémio pode levar ao atingimento do globo ocular.

As complicações neurológicas que podem preceder ou surgir após a varicela incluem a ataxia cerebelosa, formas graves de encefalite, a meningite asséptica e a mielite transversa. A encefalite pode reverter rapidamente ou agravar-se conduzindo à morte, podendo ser também uma complicação do zoster. A ataxia cerebelosa pode persistir por semanas mas é quase invariavelmente autolimitada.

Pode também estar na origem de enfartes cerebrais secundários a arterite pelo VZV (Kleinschmidt DeMasters e Gilden, 2001).

O síndrome de Reye que decorre com profunda alteração do estado de consciência e amoniémia, após a ingestão de aspirina, tem-se vindo a tornar cada vez mais raro.

A imunidade mediada por células parece ser fulcral. As deficiências imunitárias com compromisso deste tipo de defesa, a infecção pelo vírus da SIDA e altas doses de corticosteróides podem mesmo levar a fatalidades por este vírus (Alfaro et al., 2008).

O aciclovir é muito eficaz no controle destas infecções (Richman et al., 1997).

I.4.3. EBV

O EBV ou Herpesvirus 4 é um linfocriptovírus da oncogénica sub-família dos γ -1 *Herpesviridae* (figura 5).

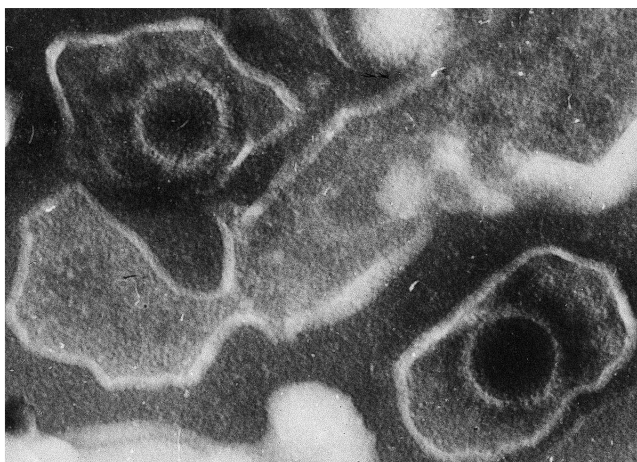


Figura 5 – Imagem de 2 viriões EBV por Microscopia Electrónica visualizando-se a cápside e o material genético envolvido por proteína (adaptado com permissão de Liza Gross, 2006).

É um dos vírus humanos mais disseminados, infectando mais de 95% da população e persistindo no indivíduo durante toda a vida, assumindo uma enorme importância patológica (Anagnostopoulos et al., 1995).

O genoma viral está rodeado pela nucleocápside icosaédrica que é envolvida pela cápsula viral. Antes do vírus entrar na célula B, a glicoproteína major da cápsula, gp350, liga-se ao receptor viral (viroreceptor), a molécula CD 21 que é simultaneamente receptor para o componente C3d do complemento, na superfície da célula B (figura 6) (Nemerow et al., 1987).

A molécula de classe II do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) serve de cofactor para a infecção das células B (Borza e Hutt Fletcher, 2002).

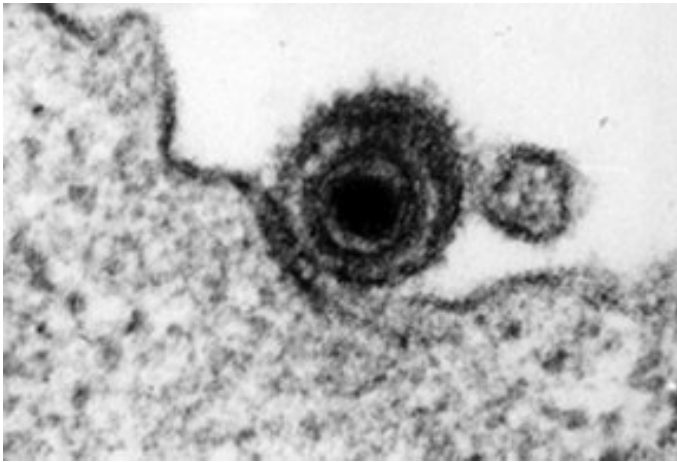


Figura 6 – Ligação do EBV à membrana celular (EBV “kiss”) (adaptado de Borza e Hutt Fletcher, 2002)

O genoma do EBV consiste numa molécula linear dupla de DNA que codifica cerca de 100 proteínas virais, algumas delas, cópias de proteínas celulares. Enquanto muitos dos genes expressos na fase lítica têm homólogos nos outros Herpesvirus, os genes expressos na fase latente são exclusivos do EBV.

A infecção das células epiteliais pelo EBV resulta em replicação activa, com produção de vírus e lise das células (infecção lítica). Durante a replicação viral lítica, cerca de 90 proteínas são importantes na regulação da expressão de genes virais, na replicação do DNA, pela DNA polimerase viral, na formação dos componentes estruturais do virião e na modulação da resposta imunológica do hospedeiro.

Em contraste, a infecção dos linfócitos B pelo EBV resulta em infecção latente, sendo expressas apenas 10 proteínas, sem produção

de vírus. Estas células transformam-se e imortalizam-se. O genoma linear do EBV torna-se circular, formando um episoma, que permanece latente nestas células B, podendo ainda integrar-se nos cromossomas do hospedeiro. Durante a fase latente o genoma viral vai ser replicado pela polimerase celular. Apenas uma pequena percentagem das células B infectadas de forma latente irão sofrer replicação lítica (Myashita et al., 1995).

A infecção ocorre pelo contacto com secreções orais, replicando-se nestas células e estando presentes na saliva. As células B presentes na orofaringe poderiam também ser assim infectadas. O vírus é, em regra, erradicado das células da orofaringe. O EBV pode infectar outros tipos de células embora com uma eficiência muito mais reduzida.

As células B de memória parecem ser o local aonde o EBV persiste na infecção latente. No adulto normal, entre 1 a 50 células B por milhão em circulação, estão infectadas pelo EBV, sendo este número estável ao longo dos anos (Yao et al., 1985).

Como já foi referido, dos quase 100 genes, apenas 10 são expressos na infecção latente das células B correspondendo a dois tipos de RNA (EBERs), seis proteínas nucleares (EBNAs) e duas proteínas latentes de membrana (LMP) e ainda alguns transcritos da região BamHI. Apenas o EBNA-1 e a LMP-1 são expressos na replicação lítica. Cinco destes genes são essenciais para a imortalização das células B.

Esta limitação acentuada da expressão de genes minimiza não só a sua patogenicidade imediata como a possibilidade de ser identificado pelo sistema imunológico do hospedeiro, prolongando a sobrevivência de ambos.

A proteína **EBNA 1** liga-se ao DNA viral e permite que o genoma do EBV se mantenha como um episoma circular, estimulando genes virais. O EBNA1 inibe a sua própria degradação pelos proteossomas,

evitando a apresentação destes péptidos às células T citotóxicas e a consequente activação das mesmas.

A proteína **EBNA 2** estimula a expressão da LMP 1 e LMP 2 bem como proteínas celulares que contribuem para o crescimento e transformação das células B.

A proteína **EBNA 3** (A-B-C) também regula a expressão de genes celulares e inibe a actividade da EBNA2.

A proteína **EBNA-LP** aumenta a actividade da EBNA2.

A **LMP 1** actua reconhecidamente como um **oncogene**, podendo estar na origem de linfomas por imortalização das células B. A LMP1 é um análogo funcional da molécula de superfície CD40. A molécula CD40 é um membro da família dos receptores do factor de necrose tumoral (TNF) e leva à activação e proliferação das células B, com activação do factor de transcrição nuclear (NF- κ B), activação da quinase *c-jun N-terminal* e estimula múltiplos genes celulares, moléculas de adesão e a produção de citoquinas (Najjar et al., 2005). Tem diversos efeitos anti-apoptóticos estimulando a expressão da A20, mcl-1, bcl-2, bfl-1 que são inibidores da apoptose. Inibe também a expressão do c-myc que, como veremos adiante, funciona como mais uma inibição da apoptose (Pagano et al., 2004).

A proteína **LMP 2** impede a reactivação do EBV, a partir da forma latente, bloqueando a fosforilação da tirosina quinase.

Os **EBERs** não codificam proteínas, mas podem ser importantes na oncogénese e na resistência à morte celular programada (Nambo et al., 2002).

Nalgumas das doenças associadas ao EBV, o padrão de latência pode ter uma expressão de genes ainda mais limitada.

Existem 4 programas diferentes de expressão destes genes, correspondendo a diversas situações patológicas.

Tabela 2 – Expressão dos genes latentes do EBV na doença (Cohen, 2000).

Padrão	EBNA-1	EBNA-2	EBNA-3	LMP-1	LMP-2	EBER	Doença
Tipo 1	+	-	-	-	-	+	LBurkitt
Tipo 2	+	-	-	+	+	+	CNF, DH, LT
Tipo 3	+	+	+	+	+	+	DLP, X, MNI
Outro	+ -	-	-	-	+	+	Portador

Abreviaturas: Linfoma de Burkitt (LB), Carcinoma da Nasofaringe (CNF), Doença de Hodgkin (DH), Linfoma de Células T (LT), Doença Linfoproliferativa (DLP), DLP-Ligado ao X, Mononucleose Infecciosa (MNI).

1.4.3.a) Evasão ao Sistema Imunológico

A capacidade do EBV persistir, apesar da intensa resposta imunológica desencadeada, em particular da imunidade celular (Svedmyr e Jondal, 1975; Royston et al., 1975; Sumaya e Ench, 1985; Todd e Tsoukas, 1996; Yewdell e Bennink, 1997), significa que o vírus desenvolveu estratégias para iludir o sistema imunológico, interessando-lhe um equilíbrio vitalício com o hospedeiro, fazendo justiça à sua denominação de linfocriptovírus (Amyes et al., 2003; Neves, 2007).

Como já foi descrito, um vírus mais simples, como por exemplo o vírus Ébola, pode ser extremamente destrutivo e mortal para o hospedeiro mas fica desta forma limitado o período de tempo durante o qual podem ser contagiados novos hospedeiros. Os grandes vírus, como os Herpesvirus, apresentam muitos genes (>100), muitos deles cópias subtraídas ao genoma celular, que permitem conduzir e reverter a seu favor, diversas vias e mecanismos, levando à sobrevida prolongada de ambos, com elevadíssima infecciosidade.

Várias proteínas do EBV são potentes moduladoras da resposta imunitária:

A proteína do EBV, BCRF1 é uma cópia a 80% da IL-10 que é uma importante interleucina anti-inflamatória, relacionada com as células T reguladoras. Esta viroquina, mimetizando a IL-10, inibe a síntese do interferão γ , a via TH1 (Castro et al., 1998; Castro, 1999) e inibe também a produção das citocinas pro-inflamatórias, as células T citotóxicas e as células dendríticas, actuando simultaneamente como um factor de crescimento/proliferação dos linfócitos B (Long et al., 2005).

Tabela 3 - Subtipos heterogéneos de células T reguladoras e respectivos marcadores (adaptado de Romagnani, 2006).

TIPO	ORIGEM	FENÓTIPO	MODO DE ACÇÃO	ALVO	NOTAS
T reg natural	TIMO	CD4+/CD8+ CD25 alto Foxp3+	CONTACTO CELULAR	TH1/TH2	Natural
TH1	PERIFERIA	CD4+ CD25baixo Foxp3+/-	IFN γ	TH2	
T1R	PERIFERIA	CD4+ Foxp3-	IL10	TH1/TH2	Adaptativa
TH3	PERIFERIA	CD4+ Foxp3 (?)	TGF β	TH1/TH2	Adaptativa
TH2	PERIFERIA	CD4+ CD25baixo Foxp3+/-	IL4 IL13	TH1 Macrófago	
TH1 reg	PERIFERIA	CD4+ Foxp3+	IFN γ IL10	TH2	

Abreviaturas: reg – reguladoras

Na sequência do trabalho pioneiro de Sakaguchi, em 1995 foi redefinido o efeito imunossupressor das células T reguladoras CD4+ (Sakaguchi et al., 1995). Actualmente vários subtipos estão descritos

com base em marcadores de superfície celular, na produção de citocinas, nomeadamente da IL-10 e do TGF β (*Transforming Growth Factor*), e ainda no mecanismo de acção (Haddeland et al., 2005; Cools et al., 2007; Sansoni et al., 2008), como se pode ver na Tabela 3.

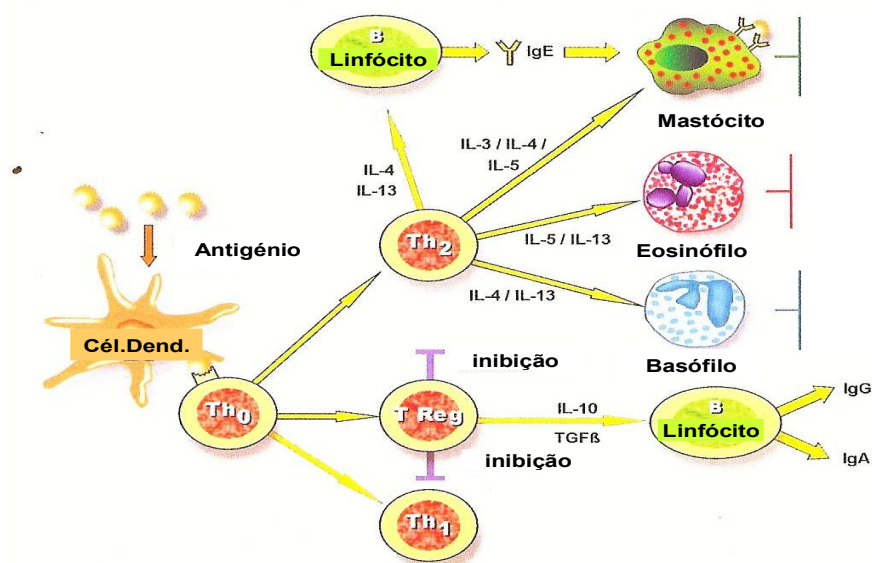


Figura 7 - Visão integrada dos mecanismos imunológicos de resposta a um antígeno. As células CD4⁺ T Helper (eg. TH1, TH2 e T reguladoras) estimuladas após a entrada do antígeno viral, são cruciais neste processo através da produção de diversas citocinas. As T reguladoras podem inibir ambas as vias TH1 e TH2, através da IL10 e do TGF β , em particular a via TH1, levando à produção preferencial de IgG e Ig A pelos linfócitos B (adaptado de Moingeon et al., 2006)

Abreviaturas: Células dendríticas.

É muito interessante notar que uma das citocinas fundamentais neste processo imunológico supressivo, recentemente descoberto, das células T reguladoras (Treg), especificamente secretoras de Interleuquina 10 (Figura 7), seja exactamente a mesma citocina que

o EBV é capaz de produzir autonomamente, como IL10 viral (Marshall et al., 2003, 2007; Papadopoulos et al., 2007; Kannai et al., 2007; Irons e Tuan Le, 2008).

A proteína BARF1 funciona como um receptor solúvel para o CSF-1R (*Colony Stimulating Factor*). Contudo a homologia com o verdadeiro receptor é muito baixa pelo que funciona, bloqueando a acção deste factor, diminuindo assim a produção do interferão α pelos monócitos e inibindo a acção das células NK.

As células do linfoma de Burkitt infectadas pelo EBV diminuem a expressão de várias proteínas que são importantes na citotoxicidade das células T, como proteínas de transporte, moléculas de adesão e moléculas de classe I do MHC.

1.4.3.b) Ciclo Celular e Apoptose

O EBV codifica pelo menos duas proteínas que inibem a apoptose das células B e das células epiteliais.

As proteínas BHFR1 e BALF1 são homólogos virais da proteína humana bcl-2 que é, por sua vez, um inibidor da apoptose.

Em termos globais, estas proteínas bloqueiam a apoptose e o interferão α e γ (Thorley-Lawson e Gross, 2004; Tselis e Jenson, 2006).

Na tabela 4 estão sumarizadas as proteínas do EBV com funções moduladoras quer da resposta imune quer da apoptose (Tsellis e Jenson, 2006).

As proteínas EBNA1 e LMP1 são, como já foi descrito, duas das proteínas expressas na fase latente.

Tabela 4 – Proteínas do EBV moduladoras da resposta imune e da apoptose (Tsellis e Jenson, 2006).

Proteína	Homólogo celular	Função
EBNA1	Nenhum	Inibe a degradação
LMP1	CD40	Inibe a apoptose
BZLF1	Nenhum	Inibe o IFN γ
BHFR 1	bcl-2	Inibe a apoptose
BALF1	bcl-2	Modula a apoptose
BARF-1	CSF-1R	Inibe o IFN α
BCFR-1	IL-10	Inibe o IFN γ , IL12
gp350	Complemento	Liga-se ao CD21

Abreviaturas: Interleuquina (IL), Interferão (IFN), Factor Estimulante de Colónias (CSF).

As doenças comprovadamente associadas ao EBV constituem um amplo espectro de doenças desde a Mononucleose Infecciosa, passando pelas doenças neurológicas até aos tumores.

A Mononucleose Infecciosa (MNI) caracteriza-se pela presença de sintomas típicos como a febre, cansaço, odinofagia, amigdalite, adenopatias cervicais e esplenomegália (Sumaya e Ench, 1985). Geralmente existe linfocitose com células mononucleares atípicas, com elevação das transaminases (Horwitz., 1981; Jones et al., 1995). Em certos indivíduos pode tomar uma forma crónica denominada de infecção crónica activa a EBV (Jones et al., 1988). Pode esporadicamente ser fatal, associada ou não, a uma doença genética, a doença linfoproliferativa ligada ao cromossoma X. Outra complicação da MNI é o síndrome hemofagocítico associado ao EBV (Hogg, 1995, Castro, 1998).

As complicações neurológicas da MNI não são raras. A meningite asséptica, a encefalite, a paralisia de pares cranianos (facial), a mielite transversa, a ataxia cerebelosa, mais frequente na infância, manifestações psiquiátricas do tipo esquizofrenia aguda e depressão com ideação suicida, o síndrome de Alice no País das Maravilhas com *metamorphosis*- distorções bizarras da configuração espacial, hemiplegia aguda, neuropatias periféricas, complicações neurológicas das doenças linfoproliferativas causadas pelo EBV (Podolsky et al., 2006), o linfoma primário do SNC em doentes com SIDA (Kleinschmidt-DeMasters e Gilden, 2001).

A Esclerose Múltipla (EM), sendo uma doença inflamatória desmielinizante, parece ter uma etiologia multifactorial, nomeadamente genética e infecciosa. O EBV parece ter um papel etiológico pelo menos em alguns casos de EM. A molécula EBNA 1 do EBV e a Proteína Básica da Mielina partilham sequências homólogas, pelo que poderia instalar-se uma reactividade cruzada auto-imune, entre outros mecanismos possíveis.

O linfoma de Burkitt, os linfomas de Hodgkin associados ao EBV, a doença linfoproliferativa póstransplante, os linfomas T relacionados com o EBV, o linfoma cerebral primário, o carcinoma da nasofaringe, o leiomioma e finalmente a doença linfoproliferativa ligada ao X são tumores reconhecidamente provocados pelo EBV (Lin et al., 2005).

O tratamento das infecções pelo EBV e das doenças associadas ao EBV passa não só pela terapêutica anti-viral (aciclovir, ganciclovir, vidarabina, interferão- α , recombinantes de interleuquinas), como pela quimioterapia e pela imunoterapia. Os recursos terapêuticos têm vindo a expandir-se de forma extraordinária, com a utilização de terapêuticas imunológicas ou moleculares dirigidas contra moléculas-alvo virais. A utilização de linfócitos T citotóxicos específicos contra o EBV, por exemplo, demonstrou já ser eficaz em várias destas patologias particularmente nas doenças linfoproliferativas póstransplante (Rooney et al., 1995; Haque et al., 2002).

A problemática da vacinação contra o EBV, à semelhança da vacina contra o VZV e o Papilomavírus, envolve considerações que se prendem com o facto de ser ubiquitário, latente e oncogénico. A biologia do EBV constitui um verdadeiro desafio ao desenvolvimento de vacinas eficazes contra o EBV.

A hipótese de prevenir ou melhorar nomeadamente os cancros associados ao EBV é, à partida, aliciante.

A composição da vacina não pode contudo conter elementos transformadores potencialmente oncogénicos.

A vacinação poderia ser primária, pós-infecciosa ou terapêutica.

A vacina com a gp 350 está actualmente em estudo, como prevenção do ciclo lítico. A utilização de antígenos latentes será importante para aumentar a eficácia nas situações pós infecciosas (Locares te Al., 1997; Tróleis e Tensor, 2006).

1.4.4. CMV

O CMV é um β -Herpesvirus, que infecta o indivíduo de forma sistémica, predominantemente T linfáticos, extremamente bem adaptado ao seu hospedeiro, já que a maioria dos indivíduos não evidencia qualquer sintoma quer na infecção primária, quer na reactivação ou reinfeção.

Contudo, em situações de imaturidade ou défice imunológico, pode causar morbilidade e mortalidade importantes.

Muitas dos genes mostram homologies com genes de outros Herpesvirus, de outros agentes infecciosos (E. Coli) e do genoma humano, genes com homologia para o HLA classe I, receptores para citoquinas, genes transactivadores de promotores homólogos (HHV) ou heterólogos (HIV) (Chee et al., 1990; Doniger et al., 1999).

Como todos os Herpesvirus, o CMV utiliza a replicação em episoma.

A transmissão vertical e horizontal pode ocorrer em qualquer das situações de infecção primária, reinfeção ou reactivação. Nas

infecções primárias maternas a transmissão vertical pode atingir os 40% e causar infecção congénita de maior ou menor gravidade. A infecção pode também dar-se por transfusão ou transplantação de órgãos seropositivos a indivíduos seronegativos para o CMV.

Cerca de 70 a 90% dos adultos encontram-se infectados pelo CMV, dependendo das condições sócio-económicas (Hermouet et al., 2003).

Os quadros clínicos nos imunodeprimidos podem ser de hepatite, pneumonite, aplasia medular, retinite, polirradiculopatia e de encefalopatia (Egan et al., 1995).

A infecção cerebral parece ocorrer a partir da virémia, por infecção inicial das células endoteliais passando por contiguidade aos astrócitos e neurónios ou a partir do LCR (Egan et al., 1995; Kleinschmidt-DeMasters e Gilden, 2001; Ribalta et al., 2002).

Cobbs e colegas, em 2002, detectaram o CMV em gliomas malignos cerebrais, tendo também sido detectado pelo mesmo grupo em carcinomas da próstata (Samanta et al. 2003) e do cólon (Harkins et al., 2002).

As suas múltiplas interações com o HIV tornam este vírus um importante cofactor de infecção, agindo por transactivação de genes do HIV (HIV LTR) ou facilitando receptores alternativos para o HIV (Leach e tal., 2002).

A imunidade celular é o meio mais eficaz de controlo imunológico do CMV e, à semelhança doutros Herpesvirus, o CMV interfere com a regulação do Complexo Major de Histocompatibilidade, classe I (Zou et al., 2005).

Estão em estudo vacinas para o CMV, com estirpes atenuadas ou recombinantes.

O interferão, foscarnet, aciclovir, ganciclovir e valaciclovir são algumas das terapêuticas disponíveis para o CMV (Crumpacker, 2004).

I.4.5. HHV6

Inicialmente denominado “*Human B-Lymphotropic Virus*” (Salahuddin et al., 1986), verificou-se mais tarde que era predominantemente T linfotrópico (CD4). Está classificado como um β -Herpesvirus (Gompel et al., 1995).

A infecção primária ocorre na infância, sendo o agente causal do exantema súbito.

Existem 2 subtipos, a variante A e a variante B. O HHV6 A está relacionado com doenças linfoproliferativas enquanto o HHV6 B está relacionado com o exantema súbito.

O HHV6 A replica-se predominantemente nos linfócitos imaturos e o HHV6 B nos maduros.

Existe uma elevada seroprevalência em relação a este vírus, estando presentes anticorpos na maioria da população muito precocemente, ao ano de idade, em quase todas as regiões do globo.

O HHV6 e o HHV7 iludem o sistema imunológico, provocando uma inibição da resposta de tipo I, do MHC, à semelhança de outros Herpesvirus (Trgovcich et al., 2002).

O HHV6 estimula as células T(CD4) e as células NK (*natural killer*) e inibe as células T(CD3), induzindo a libertação do IFN α , IL1 β e o TNF α .

Esta actividade tão alterada de estimulação policlonal e das citoquinas poderia eventualmente contribuir para a instalação de doenças linfoproliferativas, como o linfoma e a leucémia (Knox et al., 1995).

O receptor de superfície do vírus é o do CD46 e o mesmo que o do vírus do sarampo.

O HHV6 e o HIV infectam a mesma célula T(CD4). A molécula CD4 de superfície é induzida pelo HHV6 tornando-a mais susceptível ao HIV. A transacção de vários genes do HIV ocorre, quando há co-infecção (Doniger et al., 1999).

O seu envolvimento na oncogénese e na esclerose múltipla é suspeitado mas difícil de comprovar, dada as suas características de presença latente.

O HHV6 pode causar para além do exantema súbito, hepatite, linfadenite e encefalite podendo evocar um síndrome mononucleósica. Pode também provocar 1/3 das convulsões febris na criança que embora em regra tenham bom prognóstico, traduzem a invasão cerebral durante a infecção (Kawada et al., 2003).

Já foi detectado por PCR em tecido cerebral normal e em linhagens celulares de astrocitomas (Luppi et al., 1994; Kleinschmidt-Demasters e Gilden, 2001; Yoshikawa et al., 2001).

Em doentes imunocomprometidos a infecção pode ser grave e ocasionalmente fatal.

O ganciclovir, o cidofovir e o foscarnet estão em estudo como agentes inibitórios da replicação do HHV6 (Kleinschmidt-Demasters e Gilden, 2001).

1.4.6. HHV7

A infecção primária pelo HHV7 ocorre também na infância mas um pouco mais tardiamente do que a infecção a HHV6 de acordo com estudos seroepidemiológicos (Takahashi et al., 1997).

É também T(CD4) linfotrópico (Frenkel et al., 1990). Mostra grande analogia com o HHV6 e o CMV estando classificado como um β Herpesvirus. A transmissão parece ser semelhante à do EBV.

O vírus utiliza o receptor CD4 que é o mesmo receptor utilizado pelo HIV1. A semelhança do HHV6 inibe a resposta tipo I do MHC.

Parece causar também o exantema súbito e algumas convulsões febris (Clark et al., 1997) e tem sido encontrado em doentes com síndrome de fadiga crónica (Kimberlin, 1998; Kawada et al., 2003).

Estabelece latência em vários tipos de células (células mononucleares, rim, pulmão, SNC) (Clark et al., 1997).

O HHV7 é inibido pelo cidofovir e pelo foscarnet.

I.4.7. HHV8

O HHV 8 é membro da oncogénica sub-família dos Radinovírus ou γ -2 Herpesvirus (Flore, 2004).

À semelhança do EBV, o seu genoma contém homólogos virais que codificam várias proteínas importantes na regulação da proliferação (factores de crescimento) e na modulação imunitária, que contribuem para a patogénese das neoplasias associadas ao HHV8 (Lan et al., 2005; Al Mehairi et al., 2005). Codifica assim uma viroquina que é um homólogo da IL6. Trata-se de uma importante citocina pro-inflamatória que induz o desvio para TH2 (Cannon et al., 1999).

A seroprevalência do HHV8 na população em geral, é muito variável, sendo baixa nos países mais desenvolvidos (inferior a 10%) e podendo atingir os 40 a 60% na África Central e Brasil. Nos indivíduos infectados pelo HIV pode atingir os 80%. Parece ocorrer mais tardiamente, após a adolescência (Lennet et al., 1996).

A transmissão pela saliva e por via sexual são as mais importantes, podendo também ser transmitido verticalmente ou por transfusão, permanecendo posteriormente latente.

Três doenças estão associadas etiológicamente ao HHV8:

- todas as formas de sarcoma de Kaposi em doentes com ou sem infecção pelo HIV (Cesarman et al., 1995; Moore et al., 1995, 1996)
- linfoma de efusão primária da cavidade abdominal,
- doença de Castleman multicêntrica (Castro et al., 1995; Soulier et al., 1995; Cesarman, 2003).

Também à semelhança do EBV, este vírus tem linfotropismo B, existindo linhas de evidência recente, de uma forte associação à linhagem de células plasmocitárias (Duprez et al., 2004). O perfil genético do linfoma de efusão primário é semelhante ao dos plasmócitos transformados e os linfomas associados à doença de Castleman multicêntrica são proliferações policlonais plasmoblásticas. Um caso raro de leucémia plasmoblástica com infecção pelo vírus da

hepatite C e co-infecção com o HHV8 foi recentemente relatado (Hermouet et al., 2003).

O sarcoma de Kaposi (SK) é a neoplasia mais frequente nos indivíduos com infecção pelo HIV, mas também surge em indivíduos não infectados pelo HIV, na zona do Mediterrâneo (SK clássico), na África equatorial (SK endêmico) e póstransplante, sendo todos causados pelo HHV8.

O HHV 8 é inibido pelo ganciclovir, foscarnet e cidofovir (Grundhoff e Ganem, 2004).

I.5. TUMORES CEREBRAIS

I.5.1. *Tumores Infantis*

Alguns tumores infantis comportam-se, por vezes, como verdadeiras doenças virais, na medida em que surgem e desaparecem sem sequelas com o tratamento. Tal é o caso de certos tumores hematológicos e também o de alguns tumores cerebrais.

As leucémias e linfomas são uma das patologias oncológicas mais frequentes na infância e os tumores cerebrais correspondem ao tumor sólido mais frequente na criança (Voute et al., 1998).

I.5.2. *Tumores do SNC*

Histologicamente o **Sistema Nervoso Central (SNC)** é estruturado pelos elementos seguintes:

1- os neurónios - são a unidade funcional do SNC e, excepto na fase de desenvolvimento, são incapazes de se replicar, sendo selectivamente muito vulneráveis.

2 - células de suporte especializadas (células gliais) - são de 4 tipos: os astrócitos, os oligodendrócitos, micróglia e as células ependimárias.

os astrócitos - com os seus delicados processos citoplásmicos, formam uma camada fibrilar citoplásmica, de suporte para os neurónios (correspondendo de certa forma aos fibroblastos embora sem produção de colagénio), **proliferando após lesão.**

os oligodendrócitos - são responsáveis pela formação de mielina em torno dos axónios.

a micróglia - é o equivalente dos macrófagos no SNC.

as células endoteliais - revestem os ventrículos cerebrais e o canal medular.

3 - os vasos sanguíneos cerebrais - têm uma estrutura especializada que mantém a denominada barreira hemato-encefálica. Esta estrutura limita a passagem do compartimento vascular para o SNC, criando assim condições muito particulares, quer metabólicas, quer imunológicas (Greenberg et al., 2002).

A noção de “santuário” imunológico, relativamente ao tecido cerebral, é assim uma realidade embora de contornos ainda mal explicados (Evans et al., 2003).

As interrelações entre as células do sistema imunológico e do sistema nervoso, sistemas estes destinados a assegurar a homeostasia interna, são íntimas e muito complexas, constituindo a base da psiconeuroimunologia. A existência de receptores para neurotransmissores e citoquinas, em ambas as células de cada sistema, é uma evidência desta interdependência (Roitt, 1994; Révillard, 1995).

Morte neuronal e resposta astrocítica:

Numa fase precoce de lesão, os neurónios sofrem alterações e morrem, sendo removidos pelas células fagocíticas. Há associadamente **proliferação dos astrócitos** que irão ocupar a área lesada.

Em contraste com a inflamação aguda, que é caracterizada por alterações vasculares, edema e infiltrado predominantemente neutrofílico, a inflamação crónica caracteriza-se por infiltrado de macrófagos, nódulos de microglia perivasculares, **linfócitos e plasmócitos**. Após a destruição induzida pelas células inflamatórias dá-se a regeneração tissular, com **proliferação astrocitária** (Burkitt et al., 1996; Kumar et al., 1997).

Os tumores cerebrais correspondem ao tumor sólido mais frequente na infância (Voute et al., 1998).

Os tumores primários do SNC variam muito em comportamento, desde crescimento lento a crescimento rápido.

Os diferentes tipos de tumor têm diversos padrões de incidência etária e de localização preferencial, podendo corresponder eventualmente a diferentes tipos de agressão.

Os tumores cerebrais mais frequentes na infância são os que têm origem em células embrionárias, os ependimomas do IV ventrículo, e ainda **os astrocitomas** do cerebelo, com maior incidência na criança e adolescentes (Kurzrock e Talpaz, 1999)

Os tumores de origem astrogial apresentam um espectro de diferenciação que pode ir de astrocitoma de baixo grau (benigno) passando pelo astrocitoma anaplástico (elevada celularidade e proliferação endotelial) com grau intemédio de crescimento e recorrência, até ao glioblastoma multiforme com uma população celular mista, com áreas de necrose, sendo este último, de muito mau prognóstico (Louis et al., WHO, 2007).

Os astrocitomas pilocíticos ou astrocitomas pilocíticos juvenis têm origem nas células astrocitárias e são mais frequentes na criança embora possam ocorrer em qualquer idade. A localização mais frequente é no cerebelo mas podem surgir em qualquer localização do SNC. Têm em regra um comportamento indolente e menos agressivo.

Apresentam prolongamentos celulares muito alongados “pilocíticos” (Figura 8) positivos para GFAP (*glial fibrillary acid protein*). Embora as células possam mostrar alguma atipia, é raro que sejam francamente malignos.

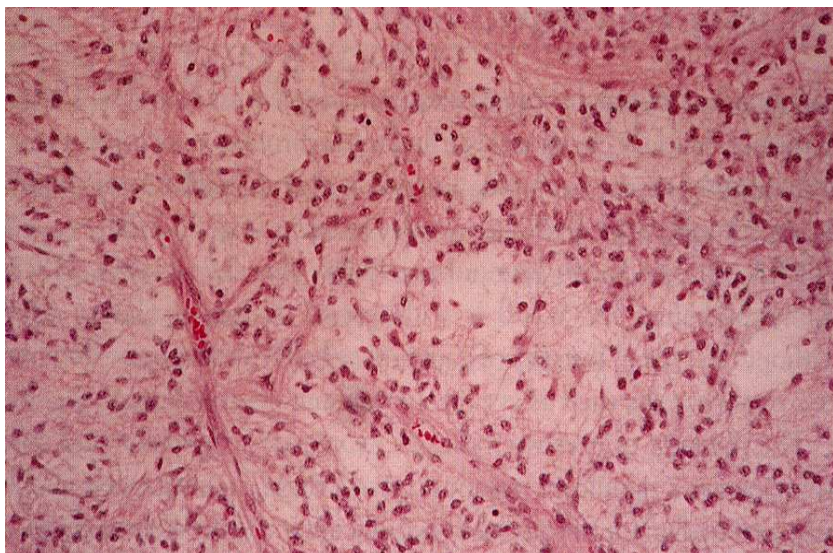


Figura 8 – Astrocitoma pilocítico (Adaptado com permissão de Jeffrey Bruce, 2006)

Clinicamente, na maioria das vezes, o primeiro sintoma pode surgir como uma convulsão, podendo associar-se outros sintomas como cefaleias, vômitos, ataxia, alterações da visão ou motoras.

O diagnóstico faz-se por Tomografia computadorizada ou Ressonância magnética.

Os doentes com tumores facilmente ressecáveis, como os localizados nos hemisférios cerebelares, têm em regra um excelente prognóstico (Kumar et al., 1997). Quando metastizam, fazem-no em regra por via linfática (Greenberg et al., 2002; Strik et al., 2004).

I.6. MECANISMOS DE ONCOGÉNESE

Desde a década de oitenta que se tem vindo a assistir a uma evolução explosiva, na compreensão dos mecanismos moleculares da patogénese do cancro.

Cancro é assim um termo de carácter geral, para um espectro de doenças muito diferentes, caracterizadas pela proliferação incontrolada e metastização.

O advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permitiu não só a decifração do Genoma mas também a detecção, com extraordinária sensibilidade, dos defeitos genéticos que conduzem à oncogénese.

O genoma humano é constituído por cerca de 10^5 genes que são controlados por cerca de 10^3 genes reguladores. Estima-se que 10^2 destes genes regulatórios são potencialmente oncogénicos, se sofrerem mutações.

Em suma, o cancro é uma doença dos genes, na qual várias alterações vão sendo adquiridas ao longo do tempo, originando um clone de células com um crescimento facilitado e incontrolado em relação às células normais (Voute et al., 1998).

Peyton Rous, em 1909, descobriu o vírus do sarcoma de Rous que provocava tumores nas galinhas infectadas. Cerca de 70 anos mais tarde a relação entre as alterações genéticas e as propriedades fenotípicas estáveis encontradas nos tumores foi curiosamente confirmada pela análise do conteúdo genético de RNA destes retrovírus animais, conhecidos como o factor etiológico de muitos tipos de cancros no mundo animal. Todos os retrovírus contêm informação genética para três proteínas virais específicas (env, gag e pol). Os tumorigénicos têm um gene extra chamado de oncogene viral (v-onc), responsável pela transformação maligna das células infectadas. Este gene resultou da incorporação pelo vírus, de um gene celular que sofrera alterações no sentido de se tornar activo.

O papel dos oncogenes, apoptose (morte celular programada), factores de transcrição e dos vírus são aqui brevemente revistos.

Alterações dos genes têm assim um papel fundamental, no aparecimento do cancro. Genes específicos, geralmente envolvidos nos processos reguladores principais, como a divisão celular, a diferenciação ou transcrição ou ainda a apoptose, podem sofrer alterações ou serem eliminados do genoma celular por diversas causas exógenas ou endógenas (Kurzrock e Talpaz, 1999).

Em termos gerais, quatro tipos de genes podem afectar a homeostasia celular: **os oncogenes, os genes supressores de tumores, os genes da morte celular e os genes que aumentam a sobrevida da célula.**

Os oncogenes actuam positivamente, de forma **dominante**, nos processos de proliferação celular, resultando de genes normais - proto-oncogenes, que sofreram três vias major de alteração: mutação pontual com alteração importante da função da proteína, translocação com troca cromossómica irregular e amplificação com a aquisição de múltiplas cópias de um gene único.

Os genes supressores de tumor, em contraste, actuam na oncogénese quando a sua função está diminuída ou são inactivados, por mutação pontual ou deleção génica. A sua função normal resulta no bloqueio da proliferação celular e, consequentemente, na supressão de tumores. A actividade dos genes supressores de tumor só é perdida quando as duas cópias do gene são inactivadas, funcionando de forma **recessiva**.

As **mutações pontuais** geralmente afectam genes básicos e altamente conservados durante o processo evolutivo das diferentes espécies (*eg* carcinogénios químicos).

A **translocação** entre vários cromossomas ocorre em pontos de ruptura definidos, geralmente no meio de um gene e originam um

oncogene quimérico que codifica uma proteína de fusão dos dois genes (*eg* cromossoma Philadelphia).

A **amplificação** parece resultar de uma replicação ilegítima de um gene que ocorre mais do que uma vez, durante um único ciclo celular, reforçando assim a acção de um proto-oncogene.

As proteínas codificadas pelos oncogenes e genes supressores dos tumores (oncoproteínas) podem ter múltiplas funções, sendo não só pleiotrópicas em relação aos diferentes tipos de células, como em relação às diferentes fases do ciclo celular ou estadio de diferenciação, sendo ainda, na maioria das vezes, pouco clara, a forma como finalmente originam o tumor.

O **p53** que é um **gene supressor de tumor**, actua, vigiando as alterações do genoma e monitorizando a integridade do DNA. Quando qualquer alteração é detectada, o p53 bloqueia a proliferação celular e induz a apoptose, evitando a propagação destes erros genéticos. Quando esta função se perde surge o cancro. O p53 existe também em cerca de 50% dos cancros (Kurzrock e Talpaz, 1999).

Defeitos na Apoptose

A morte celular programada ou apoptose (Figura 9) começou a ser mais profundamente estudada, no início da década de setenta, por Kerr e colegas (1991, 1996), mostrando que se tratava de um fenómeno de auto-destruição celular, regulado geneticamente pelos chamados codões da morte, com finalidade biológica e com características que o distinguem claramente da necrose (Collins, 1995; Steller, 1995).

Historicamente, quase todos os estudos se dirigiam para as alterações da proliferação celular, tendo-se verificado mais recentemente que alterações da apoptose podiam estar envolvidas na oncogénese (Martin e Green, 1995).

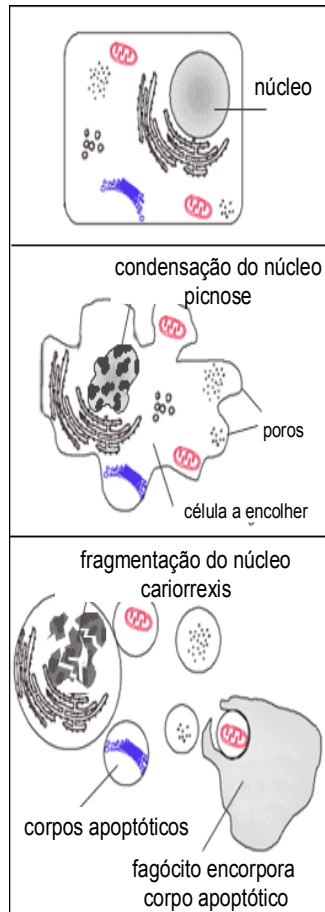


Figura 9 - Diagrama da célula em apoptose (adaptado com permissão de Emma Farmer, 2006)

Vários tipos de estímulos fisiológicos e patológicos podem desencadear o programa apoptótico. A apoptose é um processo meticulosamente orquestrado que é requerido durante o desenvolvimento embrionário e para a eliminação de células com alterações do

DNA ou ciclo celular aberrante. A lesão celular, desde que não seja tão grave que provoque a destruição imediata por necrose, em geral, leva à apoptose (Kamyama et al., 2004).

Após este sinal inicial, uma complexa rede de vias moleculares é accionada.

Assim, algumas moléculas servem para transmitir o sinal de morte, da superfície para o interior da célula, outras promovem este sinal, enquanto que outras podem bloquear este mesmo sinal de morte. Existe uma via final comum em que as caspases são activadas em cascata, levando á destruição de uma variedade de proteínas. Endonucleases são também activadas, levando à clivagem de DNA de dupla cadeia (Martin e Green, 1995).

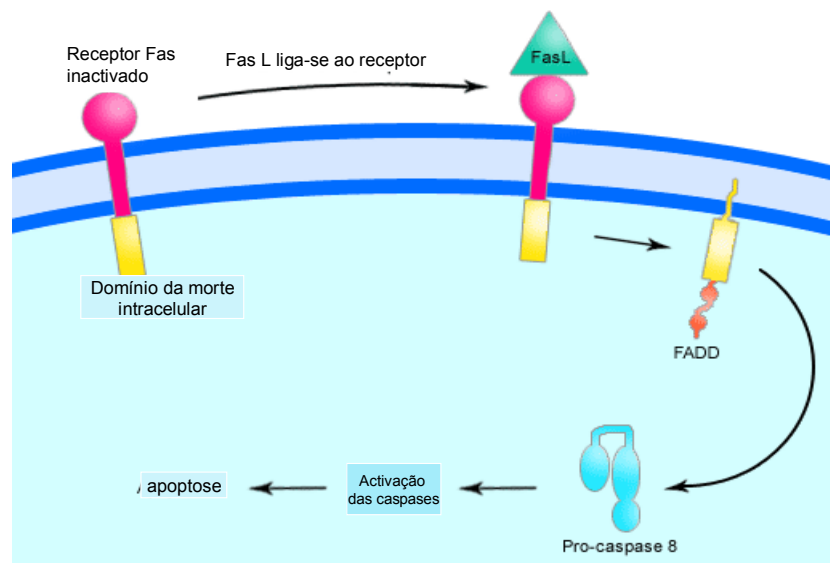


Figura 10 – Activação da apoptose pelo Fas ligando (adaptado com permissão de Emma Farmer 2006)

A **família Fas/FasL** leva à apoptose. O antígeno Fas é uma proteína de membrana celular ubiqüitária que ao interagir com o

denominado FasLigando que existe nas células NK, linfócitos T e macrófagos desencadeia a apoptose (Figura 10). Esta família tem uma importância crucial na regulação imunológica, estando envolvida na eliminação dos linfócitos activados após o término da resposta imunológica e ainda na eliminação clonal de linfócitos T e B. É também responsável pela eliminação de células infectadas por vírus. Daqui se pode depreender que a alteração deste sistema possa levar ao síndrome linfoproliferativo, à doença auto-imune e tumorigénese (Kurzrock e Talpaz, 1999).

A família bcl-2 leva ao bloqueio da apoptose. Existem vários homólogos virais do gene bcl-2 (o E1B-19 K do Adenovírus e os BALF1 e BHRF1 do EBV) funcionando como supressores da apoptose (Hardwicks, 1997). O aumento da expressão do bcl-2 isoladamente não provoca o cancro, mas prolongando a vida da célula pode permitir a acumulação de mutações genéticas, sendo encontrados elevados níveis de bcl-2, em cerca de 50% dos cancros (Henderson et al., 1991; Kurzrock e Talpaz, 1999).

O c-myc é um oncogene que está virtualmente expresso de forma aumentada, em todos os cancros, sendo reconhecida a sua importância no linfoma de Burkitt. Está por um lado associado à proliferação celular e também ligado à apoptose ou à sua inibição, interagindo por vezes com o Fas e o gene bcl-2 (Kurzrock e Talpaz, 1999; Pagano et al., 2004).

Factores de Transcrição

O processo de transcrição ou seja a síntese de mRNA a partir do DNA depende não só do aparelho básico de transcrição mas também de várias proteínas nucleares que controlam a expressão desses genes - os factores de ligação promotores e iniciadores.

Os factores de transcrição controlam a expressão de todo o tipo de genes expressos numa célula, nomeadamente os que expressam

factores de crescimento, DNA polimerases, enzimas reparadoras do DNA, moléculas de adesão...

Os promotores em geral localizam-se na terminação 5' do ponto de iniciação da transcrição enquanto que os iniciadores podem estar localizados próximo ou longe destes pontos.

A frequência com que genes de factores de transcrição estão envolvidos na carcinogénese pode estar relacionada com um processo sucessivo de alterações, com replicação celular mantida correspondendo provavelmente a uma segunda agressão. Trata-se de um processo que não está ainda muito bem esclarecido.

Os mecanismos de escape das células tumorais à resposta imunológica têm sido intensamente estudados (Révillard, 1995).

Podem estar relacionados com mecanismos próprios do **hospedeiro**: deficiência imunitária, anomalia genética ou adquirida dos genes supressores de tumores (*eg*: p53), com anomalia dos sistemas reparadores do DNA, exposição aumentada a carcinogénios químicos e físicos, deficiência no reconhecimento de antígenos tumorais.

Podem estar relacionados com falta de **imunogenicidade do tumor**: ausência de expressão de moléculas do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC), classe I, síntese de moléculas imunossupressivas (*eg*: IL10, TGF β , PGE2) com inibição dos linfócitos tumorais infiltrantes (TIL), desvio da resposta TH1 para TH2 com síntese de anticorpos menos eficazes do que as CTL, expressão de antígenos incapazes de induzir uma resposta T celular (glicolípidos), indução de tolerância por secreção de antígenos solúveis.

Podem estar relacionados com **resistência do tumor**: velocidade de crescimento do tumor, ausência de moléculas de adesão geradoras de sinais para a lise pelos linfócitos T citotóxicos e NK, mutação de péptidos alvos da resposta imunitária, modulação antigénica por selecção clonal, dificuldade de acesso dos efectores imunológicos (CTL, Anticorpos não fixadores do complemento), aumento de

expressão constitucional ou adquirida de mecanismos de resistência à apoptose (*eg*: bcl-2) (Roitt , 1994; Révillard, 1995).

É de realçar que os Herpesvirus possuem a capacidade genética de induzir muitos destes mecanismos de escape descritos.

Em suma, os processos básicos celulares, como a replicação do DNA, a síntese de proteínas a partir do DNA e até a fosforilação oxidativa (fosfoquinases), fornecedora de energia para todos estes processos, estão implicados na oncogénese (Kurzrock e Talpaz, 1999).

Por um lado, o envelhecimento poderia levar naturalmente à acumulação de erros nestas vias metabólicas. Por outro lado, os vírus necessitam exactamente de interferir nestes pontos de funcionamento da maquinaria celular para se replicarem, sendo necessário, numa primeira fase, a transcrição dos seus próprios enzimas e proteínas, e numa segunda fase, a replicação do seu próprio DNA, com utilização da energia da fosforilação oxidativa e por vezes incorporação no DNA celular, em locais mais ou menos perturbadores, com o risco que isto acarreta de translocações e interferência com factores de transcrição.

Poderiam assim agir em simultâneo, como cofactores na oncogénese (Kurzrock e Talpaz, 1999).

I.7. ONCOGÉNESE VIRAL

A infecção viral, como foi exposto, pode contribuir para o desenvolvimento do cancro. Vários vírus DNA e Retrovírus são os mais frequentemente implicados. O vírus de Epstein-Barr (EBV) e o Herpesvírus 8 (HHV8), dois Herpesvirus, são causa de tumores e têm sido associados a variada patologia tumoral humana (Osterholm, 2000; Wang e Sugden, 2004).

Os mecanismos de oncogénese viral nos tumores malignos humanos são complexos e em regra mal aceites.

Os vírus não parecem ser suficientes para induzir uma neotransformação completa sendo necessários cofactores associados.

Além disso, no momento em que as células infectadas se tornam claramente malignas, pode ser difícil encontrar o genoma viral sugerindo que os genes virais têm um papel preponderante nas fases iniciais de transformação, perdendo-se, na sua grande maioria, no processo caótico de neo-formação (Zur Hausen, 2000).

O ciclo celular parece ser o alvo preferencial da transformação maligna. Os principais oncogenes reconhecidos interferem com este mecanismo de replicação. Os vírus são dotados de genes responsáveis pela replicação do DNA. O ciclo celular é assim de primordial importância e uma via em comum.

Leland Hartwell, Tim Hunt e Paul Nurse foram galardoados, em 2001, com o Prémio Nobel, pela descoberta dos reguladores chaves do ciclo celular- as moléculas CDK e as ciclinas. Estas funcionam respectivamente como o “motor e a embraiagem” do Ciclo Celular, podendo corresponder a verdadeiros oncogenes e a interagir em processos de oncogénese (Figura 11) (Hartwell et al., 2001).

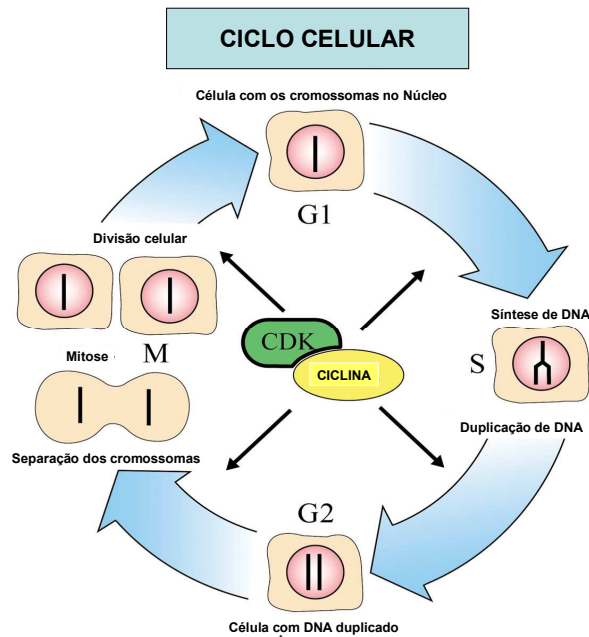


Figura 11 – Ciclo Celular

O Ciclo Celular- Na primeira fase, a fase G1, dá-se o crescimento celular. Quando a célula atinge um determinado tamanho passa à fase S, de síntese do DNA celular, com duplicação dos cromossomas. Na fase seguinte, a fase G2 a célula prepara-se para a divisão- mitose que corresponde à fase M completando o ciclo (adaptado de Hartwell et al.,2001).

Abreviatura: CDK- quinase dependente de ciclina

Os DNAvírus e os retrovírus, tendo a possibilidade de se incorporarem no genoma e de intervirem directamente no DNA, dispõem frequentemente da informação necessária, dos genes necessários, muitos deles subtraídos à própria célula, para reverterem a maquinaria e particularmente o ciclo celular a seu favor (Trgovcich et al., 2002). Agem, utilizando o sistema, à semelhança de um verdadeiro ataque bio terrorista e tornam a célula refém (Neves, 2007).

Parece pouco provável que seja pura coincidência, que as grandes descobertas sobre biologia do cancro, tenham surgido em relação com oncogenes encontrados inicialmente em retrovírus oncogénicos de animais (Rose et al., 1997, 1998; Casey, 1998). A íntima partilha entre genes celulares e virais corresponde a uma convivência, quase promiscuidade, de milhões de anos e a uma eficiente selecção por parte dos vírus, dos melhores genes para iniciar a replicação (Voute et al., 1998).

Contudo a oncogénese não é, em última análise, conveniente para o vírus latente pois isso faria com que perdesse o seu hospedeiro e portanto só ocorrerá se houver uma sucessão de erros e agressões somados. Trata-se assim de uma agressão relativamente controlada, tentando minimizar os danos colaterais do processo (Tselis e Jenson, 2006; Thorley-Lawson e Gross, 2004).

O que torna estes vírus tão esclarecedores é que eles realmente possuem a capacidade de transformar células normais em células cancerosas - através do seus próprios genes virais - actuando selectivamente nos pontos chaves que levam à duplicação do DNA e que quando espontaneamente mutados, causam tumores (Kurzrock e Talpaz, 1999).

Um exemplo paradigmático é o do linfoma de Burkitt no qual existem características translocações cromossómicas que levam à reactivação do c-myc que conduz, em primeira instância, à proliferação celular. Estas alterações são a lesão molecular unificadora, no linfoma de Burkitt já referido quer se trate do tumor endémico em África, EBV positivo, quer da forma esporádica no mundo ocidental, geralmente EBV negativa (Pagano, 2002).

CAPÍTULO II

II. OBJECTIVOS

II.1. OBJECTIVOS

Os Herpesvirus originam, em geral, infecções primárias na infância que se tornam latentes, sendo vírus predominantemente neurotrópicos e linfotrópicos, com complicações neurológicas relativamente frequentes que cursam por vezes com ataxia cerebelosa.

Por outro lado, a proliferação astrocitária pode ocorrer como resposta do tecido cerebral à agressão, eventualmente viral.

Em face dos conhecimentos actuais, colocámos duas **Hipóteses**, neste campo de investigação:

- 1.^a- Será que os Herpesvirus Humanos se encontram no cerebelo e podem estar na origem de astrocitomas pilocíticos tão frequentes na criança e no adolescente?
- 2.^a- Será que existe algum Herpesvirus ainda desconhecido que possa estar na origem destes tumores?

Perante estas Hipóteses colocámos como **Objectivos**:

- 1- Pesquisar a presença de sequências de genes das várias DNA polimerases virais, de cada um, dos oito Herpesvirus, em astrocitomas pilocíticos
- 2- Pesquisar a presença de um Herpesvirus desconhecido através de adequadas técnicas de Biologia Molecular.

II.2. MAPA CONCEPTUAL

Herpesvirus e Astrocitomas

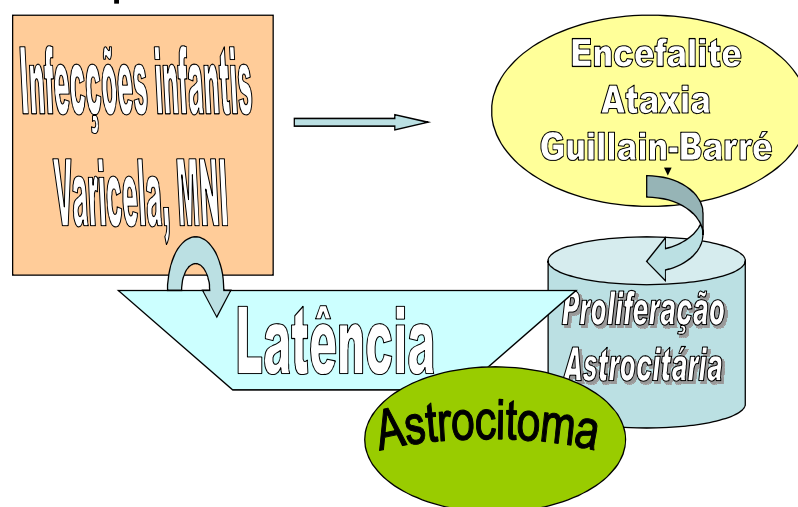


Figura 12 – Mapa Conceptual. As infecções por HHV que ocorrem frequentemente na infância, poderiam, por hipótese, estar implicadas, ao longo do período de latência, em processos inflamatórios e/ou tumorais.

CAPÍTULO III

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. GRUPOS DE DOENTES

Com a aprovação da Comissão de Ética, **10** amostras anátomo-patológicas de tecido cerebral (cerebelo) de **controlo** e **35** amostras anátomo-patológicas de tumores cerebrais, com o diagnóstico histológico de **astrocitomas pilocíticos** (30 do cerebelo e 5 com localizações extra cerebelares (pineal, cerebral, parietal, temporal, periventricular direito), obtidos de arquivos de Departamentos de Anatomia Patológica de cinco hospitais, de 1993 a 2001, correspondentes a 35 doentes com astrocitoma pilocítico, foram testadas para determinar as cargas virais de HHV, tratando-se de um estudo retrospectivo de tipo caso-controle.

A média de idades foi de 51,5 anos nos controlos e de 15,5 anos nos tumores. Sessenta por cento % eram do sexo feminino e 40 % eram do sexo masculino, nos controlos. Nos tumores, a distribuição foi de 47% para sexo feminino e 53 % para o sexo masculino.

Os astrocitomas pilocíticos correspondiam em termos de classificação da Organização Mundial de Saúde, aos diversos graus de malignidade dos tumores, desde malignidade ligeira a elevada (Louis e tal., WHO, 2007). Contudo, a descrição histológica correspondia, na grande maioria dos casos, a astrocitomas pilocíticos benignos ou de baixo grau de malignidade. Apenas 2 mereceram a classificação de elevado grau de malignidade.

Relativamente ao grupo de controlo, as 10 amostras que foi possível obter do arquivo de um dos Serviços de Anatomia Patológica,

correspondiam a indivíduos que faleceram por causas diversas nomeadamente acidentes cardiovasculares, insuficiência cardíaca ou hepática ou ainda causas acidentais, tendo sido excluídas as causas tumorais ou infecciosas. Correspondem a indivíduos maioritariamente mais idosos, dada a dificuldade na obtenção de amostras desta natureza em indivíduos mais jovens.

III.2. PROCEDIMENTOS

III.2.1. TÉCNICA E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

III.2.1.a) Preparação do DNA

A extracção do DNA foi feita a partir de amostras anatomo-patológicas dos astrocitomas e dos controlos, conservadas em formol e posteriormente parafinadas, em cortes de 10 µm, submetidas a digestão por Proteinase K, seguida de extracção por fenol-clorofórmio e precipitação pelo etanol. (Wright e Mannos, 1990)

O DNA genómico das amostras foi preparado utilizando QIAmp (*DNA mini-kits for blood and tissue kits- QIAgen, Valência, CA USA*). O DNA foi mantido a 4° C até ser utilizado quer para qPCR quer para CODEHOP PCR.

Os controlos utilizados foram de tecido do cerebello de pacientes que faleceram por patologia não tumoral e não infecciosa.

III.2.1.b) PCR quantitativa em tempo real (Rt qPCR)

A qPCR foi realizada utilizando o aparelho ABI 7700 Prism PCR, com reagentes Taqman e sondas fluorescentes da *ABI/Aplied Biosystems, Foster City, CA, USA*.

Os oligonucleótidos iniciadores (*primers*) e as sondas específicas (*probes*) para um amplicão de 80-85 pares de bases (pb) em relação com o gene da DNA polimerase do HHV1 e 2, VVZ, EBV, CMV, HHV6 variante A e B, HHV7 e HHV8 foram desenhados e estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Sequências de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) e sondas (*probes*) para detecção da DNA polimerase do HHV1, HHV2 e VZV

Primers and Probes	Sequência(5'-3')
HHV-1	
Forward primer	GCCTTCATGACCCTTGTGAAA
Reverse primer	CGTCAGCTTGGCCAGCAA
6FAM probe	CCGAGTTCGTGACCGGGTACAACATC
HHV-2	
Internal standard (fwd)	CTGGCCCTTCATGACCTTCGTCAAGCAGTACGGCCCCG AGTTCGTGACCGGGTACAACATC
Internal standard (rvse)	ATCTCCGTCAGCTTGGTCAGGACGAAGGGCCAGTCGA AGTTGATGATGTTGTACCCGGTC
Forward primer	GCCTTCATGACCTTCGTCAAG
Reverse primer	TCCGTCAGCTTGGTCAGGAC
6FAMprobe	CCGAGTTCGTGACCGGGTACAACATC
VZV	
Internal standard(fwd)	GGTCAAATCCCAAACGTTTCGAGAACGCATCCCTTATGT TATTGTCGCCCCCACA
Internal standard(rvse)	AGCTACACTTTTTGCATCAGCCTCCACTTCGTCTGTGG GGGCCACAATAACAT
Forward primer	CAAATCCCAAACGTTTCGAGAA
Reverse primer	TACACTTTTTGCATCAGCCTCC
6FAMprobe	CATCCCTTATGTTATTGTGGCCCCAC

Os *standards* internos foram feitos a partir dos amplicões da DNA polimerase de cada HHV, amplificados a partir de linhas celulares infectadas:

DNA viral para o HHV1 e produtos de hibridação para o HHV2 e para o VVZ, AA2 para o EBV, BCBL2 para o HHV 8, HSB2/HHV 6 para o HHV 6 (*AIDS Repository*), fibroblastos humanos para o CMV seguidos de clonagem a um vector TOPO- TA (*In Vitrogen, Carlsbad, CA, USA*), para o HHV7, os *standards* internos foram feitos por

hibridação de dois oligonucleótidos 54 – mer correspondentes à DNA polimerase do HHV 7, seguida de amplificação por PCR com *primers* específicos e clonagem com um vector TOPO-TA.

Tabela 6 – Sequências de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) e sondas (*probes*) para detecção da DNA polimerase do EBV, HHV8, CMV, HHV7, HHV6 A e B.

Primers and Probes	Sequence (5' - 3')
EBV	
Forward primer	TCTGCTTTTCAACGGAGCTCA
Reverse primer	ACTTCTGGTAGACGGCCAGGT
6FAM probe	GCTCTCAGCCTACAAGAGCACCCAGATG
HHV-8	
Forward primer	CGTTTACCACCGAGCTAAGCC
Reverse primer	GTAGCTTTTGGTACACGGTCAGG
6FAM probe	CGCTGGCGGACTACAAGACGCA
CMV	
Forward primer	CCTGGTGCTTTCGTCGGT
Reverse primer	CAATCGCTTAATGACGGCCAAT
6FAM probe	AAGGACATCTCGCTGTACCGTCAATCTAACC
HHV-7	
Internal standard (fwd)	ATTTCTGCCTACAAGCAAGCAAATTTACCACATTTG GCTGTTGTAAAAAGGTTA
Internal standard (rvse)	CTCCTATGTTTGGCAACTCTTCCTTTCTTTGAGCTAA CCTTTTAACAACAGCCAA
Forward primer	TCTGCCTACAAGCAAGCAAATTT
Reverse primer	CTATGTTTGGCAACTCTTCCTTTCT
6FAM probe	TGAGCTAACCTTTTAACAACAGCCAAATGTGG
HHV-6 (A and B)	
Internal standard (fwd)	AATGTTGTCCTCTGTGCTTTCCAAGGA
Internal standard (rvse)	TTACCAATAGATGGTGCTATTAACACATAC
6FAM probe	TCTGCGCCAACCTTCTAATGACGCTAA
HHV-6A	
Forward primer	GTTGTCCTCTGTGCTTTCCAAA
Reverse primer	GCCAATAGATGGTGCTATTAACACG
HHV-6B	
Forward primer	TGTTGTCTTCTGTGCTTTCCAAG
Reverse primer	TTACCAGTAGATGGTGCTATTAACACA

Após verificação de cada clonagem por sequenciação, as preparações de DNA dos TOPO-TA *constructs* contendo os amplicões da DNA polimerase dos HHV1 e 2, VVZ, EBV, CMV, HHV6 A e B, HHV7 HHV8 foram utilizados como cópias de número standardizado para as reacções de qPCR.

A especificidade, sensibilidade e reproductibilidade foram verificados utilizando DNA de células conhecidamente infectadas pelos HHV estudados.

Assim, a qPCR desenvolvida foi mono-específica e muito sensível (<10 cópias de DNA viral por cada 100ng de DNA celular). Foram totalmente reproductíveis para amostras com um nº de cópias superior a 50. Para amostras com menos de 50 cópias/100ng de DNA, diversas amplificações independentes de qPCR foram realizadas; as amostras eram consideradas positivas quando pelo menos duas qPCR independentes foram positivas.

As qPCR, para cada um dos HHV referidos, foram realizadas com 100 ng de DNA por reacção. Isto corresponde aproximadamente a 15 000 células assumindo que cada célula contém 6 pg de DNA. A amplificação foi realizada com 25 ul de volume por reacção durante 40 ciclos (15 s a 95°C, 1 minuto a 60°C). A maioria das amostras com baixo número de cópias foram testadas pelo menos duas vezes. Os resultados estão expressos como a média do número de cópias de DNA polimerase de HHV por 100 ng de DNA celular.

III.2.1.c) PCR CODEHOP

Para pesquisar a presença de algum novo HHV, as amostras que tinham sido negativas para HHV foram analisadas pela técnica de PCR CODEHOP com conjuntos de *primers* desenhados para reconhecer todos os HHV, conforme já foi descrito por Rose e colegas (Van Devanter et al., 1996; Rose et al., 1997, 1998; Casey, 1998; Quackenbush et al., 1998). Estes *primers* foram modelados em

sequências consensuais de aminoácidos do gene mais bem conservado dos HHV, a DNA polimerase, com um terminal 5' consensual e uma sequência 3' degenerada. Os *primers* foram ligeiramente modificados para os tornar mais próximos das sequências dos HHV conhecidos (Hermouet e tal., 2003).

A PCR CODEHOP para HHV foi realizada, utilizando 100ng de DNA. Uma reacção de PCR *semi nested* foi realizada, utilizando primeiro 100 p moles de DFAS (γ/α Herpesvirus) ou DFQS (β Herpesvirus) e GDTD *primers* (55° C, 35 ciclos). Depois, 2% da reacção PCR foi submetida a uma segunda amplificação, utilizando 100 pmoles de TCNAVYG e GDTD *primers* nas mesmas condições. Os *primers* foram testados em DNA extraído de células infectadas com um número conhecido de diferentes HHV (determinado por qPCR). Produtos de PCR CODEHOPE direccionadas para amplificar os amplicões da polimerase dos HHV foram separados em gel de agarose a 2,8% (o tamanho esperado para os produtos de PCR é aproximadamente de 225 pares de bases para os HHV). Os amplicões de PCR do tamanho esperado foram purificados e depois clonados no vector TOPO-TA para sequenciação. As sequências de amplicões foram analisadas em comparação com sequências de vírus conhecidos disponíveis em bancos de dados (*NCBI Blast search*).

III.2.1.d) Imunohistoquímica

As amostras que foram positivas para o EBV por PCR, com cargas virais em regra muito baixas, foram estudadas também por imunohistoquímica, sendo utilizado anticorpos anti-LMP-1 (Proteína Latente de Membrana). O estudo foi feito em cortes parafinados fixados em lâminas com poly-L-lisina. Uma amostra infectada pelo EBV, do repositório do hospital, foi utilizada como controle imunohistoquímico.

O NCL-EBV- CS 1, 2, 3 e 4 reage com a proteína latente de membrana de 60 kD (LMP-1) codificada pelo gene BNLF1 do EBV, (*Novocastra Laboratories, UK, Pallesen 1991*).

III.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Kruskal Wallis foi utilizado para comparar os dados de diferentes grupos de doentes. O teste de Fisher exacto foi utilizado para comparar proporções. O valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Os astrocitomas e controlos foram estudados globalmente e ainda foram efectuadas comparações entre grupos (1 e 2) - com idade inferior ou superior a 20 anos - e ainda relativamente ao sexo. (Apêndice- Estatística)

CAPÍTULO IV

IV. RESULTADOS

IV.1. RESULTADOS

IV.1.1. CARGAS VIRAIS DOS HERPESVIRUS

A presença e a carga viral de todos os HHV conhecidos, HHV1 e 2, VVZ, EBV, CMV, HHV6 A e B, HHV7 HHV8, foram estudadas por qPCR, pesquisando a DNA polimerase de cada HHV, em preparações de células tumorais (astrocitomas pilocíticos) de 35 doentes; os dados estão detalhados na Tabela 7.

IV.1.1.a) Valores das Cargas Virais de HHV 1 e 2

Uma amostra de tumor foi positiva para HHV1 (vírus neurotrópico) (cargas: 0.96 cópias/ 100 ng DNA) bem como 1 amostra de tecido cerebelar de controlo (4,6 cópias /100 ng DNA). Um controle de cerebelo foi positivo para o HHV2 (99 cópias/100ng DNA). Nenhuma amostra de tumor foi positiva para HHV 2.

A prevalência da infecção por estes dois vírus na população é muito diferente, rondando os 80% para o HHV1, sendo muito menor para o HHV2 (25- 30%) (Whitley et al., 1997).

IV.1.1.b) Valores das Cargas Virais de VVZ

Trata-se também de um vírus com neurotropismo bem descrito, particularmente na sua fase de latência. Duas amostras de tumores foram positivas (cargas: 3.3 e 45 cópias/100ng DNA). Os controles foram todos negativos para o VVZ.

Atinge a quase totalidade da população (Whitley et al., 1997).

IV.1.1.c) Valores das Cargas Virais de EBV e HHV 8

A presença e carga viral do EBV e HHV 8, γ Herpesvirus, ambos reconhecidos pela sua capacidade oncogénica e linfotropismo B, foi muito diferente.

O EBV foi positivo em 9 amostras de tumores e em 7 controlos de cerebelo, embora com baixo número de cópias (vide tabela 3 e gráficos 1, 2 e 3).

O HHV 8 foi positivo em apenas 1 amostra de tumor (1,6 cópias/100ng DNA), sendo negativo em todos os controlos.

A maioria dos estudos apontam para uma taxa de infeção com o EBV que pode atingir os 98% da população (Whitley et al., 1997).

Relativamente ao HHV 8 esta taxa é muito variável, sendo inferior a 4% na população da Europa Ocidental (Lenet et al., 1996).

IV.1.1.d) Valores das Cargas Virais de CMV

Apenas uma amostra de astrocitoma foi positiva com 6,5 cópias/100ng DNA, não tendo sido identificado nos controlos de cerebelo.

A incidência na população em geral varia entre os 50-90% (Whitley et al., 1997).

Tabela 7 – Cargas virais de Herpesvirus detectados em tecido normal do cerebelo e nos astrocitomas

Pacientes	Sexo	Idade	Biopsia	Número de cópias de HHV / 100 ng de DNA Celular								
			Localização	HHV-1	HHV-2	VZV	EBV	CMV	HHV-6A	HHV-6B	HHV-7	HHV-8
Controlos												
E1	F	7 m	cerebelo	0	0	0	7	0	0	ne	ne	ne
E2	F	21 a	cerebelo	0	0	0	4	0	0	ne	ne	ne
D7	M	29 a	cerebelo	0	0	0	3	ne	0	0	0	0
D8	M	35 a	cerebelo	0	0	0	21	0	0	0	0	0
D9	M	44 a	cerebelo	0	0	0	12	0	0	0	0	0
D12	F	59 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E3	M	60 a	cerebelo	0	99	0	3	0	0	ne	ne	ne
D10	F	72 a	cerebelo	0	0	0	ne	0	0	0	0	0
D11	F	77 a	cerebelo	5	0	0	1	0	0	ne	ne	ne
D6	F	89 a	cerebelo	0	0	0	0	ne	0	0	0	0
Astrocitomas												
F1	F	1 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G10	M	2 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F9	F	2 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F3	F	3 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F5	F	4 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F3	F	5 a	cerebelo	0	0	0	7	0	0	0	0	0
F1	F	5 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F8	F	6 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E5	M	6 a	cerebelo	0	0	3	0	0	0	0	0	2
E11	M	6 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E12	F	8 a	cerebelo	0	0	0	4	0	0	0	0	0
F2	F	13 a	cerebelo	0	0	0	7	0	0	0	0	0
F11	M	13 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G1	F	13 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G9	M	14 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G5	F	15 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	M	16 a	cerebelo	0	0	45	0	0	0	0	0	0
G8	F	16 a	pineal	1	0	0	0	7	0	0	0	0
E6	M	18 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	F	18 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E4	M	19 a	cerebelo	0	0	0	22	0	0	0	0	0
F4	M	19 a	temporal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G3	M	19 a	parietal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F6	M	20 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F7	M	23 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F12	M	23 a	ventriculo lat	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F4	F	29 a	cerebelo	0	0	0	4	0	0	0	0	0
E10	M	28 a	cerebelo	0	0	0	1	0	0	0	0	0
E9	M	30 a	cerebelo	0	0	0	1	0	0	0	0	0
F10	F	31 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G6	F	52 a	cérebro	0	0	0	0	0	0	0	7	0
G7	F	59 a	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G4	nd	nd	cerebelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E7	nd	nd	cerebelo	0	0	0	4	0	0	0	0	0
E8	nd	nd	cerebelo	0	0	0	94	0	0	0	0	0

ne = não executado (material insuficiente); nd = não disponível; F=feminino; M= masculino.

IV.1.1.a) Valores das cargas virais de HHV6 e HHV7

O HHV6 e 7 são vírus T linfotrópicos. Foram descritas duas variantes do HHV6, os tipos A e B.

Todas as amostras quer de tumores quer de controlos foram negativas para o HHV6. O HHV7 estava presente apenas numa amostra de astrocitoma (7,1 cópias/100ng de DNA).

Na população em geral, na Europa e nos Estados Unidos, o HHV6B é duplamente mais prevalente (70%) do que o HHV6A (30%), enquanto que em África, o HHV 6A parece ser predominante (Di Luca et al., 1994). Estão em curso estudos epidemiológicos, relativamente ao HHV7 que parecem indicar elevada prevalência (Black e Pellet., 1999).

IV.1.2. PCR CODEHOP

Oito amostras (3 de controle e 5 de tumores) foram seleccionadas para PCR CODEHOP, dada a sua negatividade para HHV conhecidos, já determinada pela qPCR.

Duas séries de PCR CODEHOP foram realizadas, uma com os *primers* DFAS desenhados para detectar os α e γ HHVs, a outra com *primers* DFQS desenhados para detectar os β HHVs (Tabela 2). As PCR CODEHOP foram negativas para amostras de controlo. Duas amostras de astrocitomas foram positivas para uma ou para ambas as PCR CODEHOP. A sequenciação dos produtos da PCR revelaram sequências de EBV. Não foi encontrada nenhuma nova sequência eventualmente correspondente a um novo HHV.

IV.1.3. IMUNOHISTOQUÍMICA

As amostras EBV positivas por qPCR foram negativas por imunohistoquímica com exceção de uma que foi duvidosa.

IV.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS

IV.2.1. CARGAS VIRAIS DOS HERPESVIRUS

Podemos verificar que foi possível identificar a presença da DNA polimerase do EBV em 9 dos 35 astrocitomas. O HHV1, o VZV, o CMV, o HHV7 e 8 também estavam presentes em alguns astrocitomas

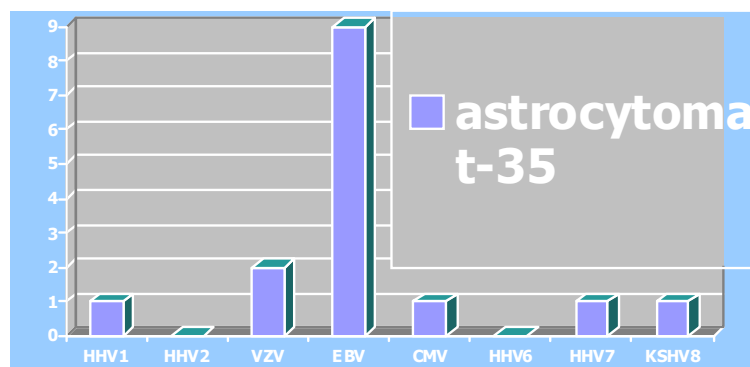


Gráfico 1 - Herpesvirus identificados nos Astrocitomas

O EBV está também presente em 7 controlos de cerebelo. O HHV1 e 2 também estão presentes em 2 dos controlos, respectivamente.

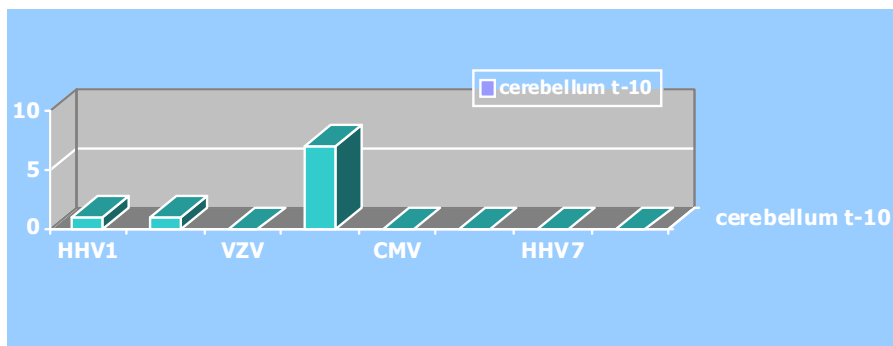


Gráfico 2 – Herpesvirus presentes nos controlos.

Podemos verificar que o EBV está presente num total de 16 amostras anatomo-patológicas, mas em termos relativos/percentuais está mais presente nos controlos (70%).

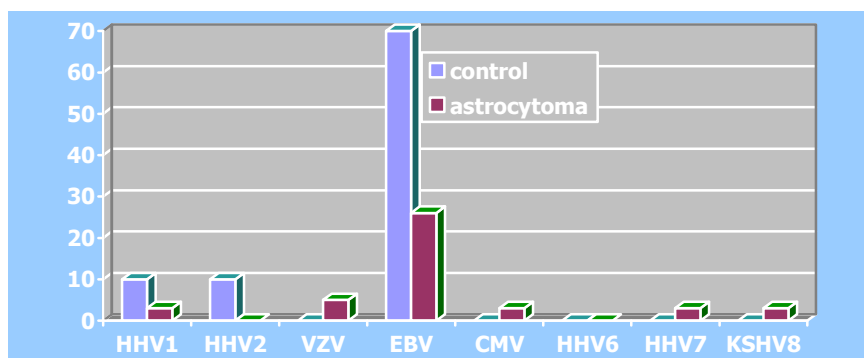


Gráfico 3 – Prevalência relativa nos controlos e nos tumores

Em 2 dos doentes com astrocitoma, uma criança de 6 anos e uma jovem de 16 anos, foram identificados 2 vírus simultâneamente. O VZV e o HHV8 foram encontrados no primeiro caso e HHV1 e o CMV

foram identificados no segundo, tendo este último a particularidade de se tratar de um astrocitoma pilocítico pineal. Em 2 controlos foram também identificados 2 HHV, o HHV2 e o EBV num indivíduo de 60 anos e o HHV1 e o EBV numa mulher de 77 anos.

A DNA polimerase dos vários HHV foi assim detectada em 7 controlos e em 13 astrocitomas atingindo o total de 20 amostras positivas (20/45).

IV.2.2. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

Globalmente, a presença do EBV quer nos controlos quer nos astrocitomas pode considerar-se estatisticamente muito significativa.

Relativamente aos grupos étarios analisados (1 e 2) e dado que os astrocitomas são muito mais frequentes nas crianças e adolescentes verificou-se que 71,88% dos indivíduos com tumor tinham menos de 20 anos, contrastando com apenas 10% dos controlos neste mesmo grupo etário. No grupo de controlo, os indivíduos tinham maioritariamente idades mais avançadas, dada a dificuldade na obtenção deste tipo de amostras e a natureza das patologias não infecciosas nem tumorais que foram causa de morte. A idade máxima encontrada nos astrocitomas foi de 59 anos enquanto nos controlos foi de 89 anos. Na totalidade, a média de idades nos astrocitomas foi de 15,5 e nos controlos foi de 51,5. A distribuição etária das amostras EBV positivas quer de controlos quer de astrocitomas não revelou predomínio evidente por nenhum grupo etário em particular. (Vide Tabela 8 e Apêndice - Análise Estatística)

Relativamente ao nº de cópias encontradas no grupo EBV positivo, estas foram todas inferiores a 22 cópias, com excepção de uma única amostra de astrocitoma que revelou 94 cópias. Relativamente aos restantes casos, apenas 1 controlo teve 99 cópias de HHV2, e, um astrocitoma com 45 cópias de VZV, sendo todos os outros valores <10.

Tabela 8 – Análise estatística. Comparação entre os grupos 1 (<20 anos) e 2 (≥ 20 anos)

Idade Grupo	Patologia		idade (anos)	Ebv	Cmv	hhv6	hhv7	Hhv8	hhv1	hhv2	Vzv
1	Astrocitoma	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23
		Mediana	13	0	0	0	0	0	0	0	0
		Min	1,4	0	0	0	0	0	0	0	0
		Max	19	22	6,5	0	0	1,6	1	0	45
		% Astrocytoma	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%
	Control	N	1	1	1	0	0	0	1	1	1
		Mediana	0,6	7,3	0	-	-	-	0	0	0
		Min	0,6	7,3	0	-	-	-	0	0	0
		Max	0,6	7,3	0	-	-	-	0	0	0
		% Control	10,00%	11,11%	12,50%	0,00%	0,00%	0,00%	10,00%	10,00%	10,00%
2	Astrocitoma	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mediana	29	0	0	0	0	0	0	0	0
		Min	20	0	0	0	0	0	0	0	0
		Max	59	3,7	0	0	7,1	0	0	0	0
		% Astrocytoma	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%
	Control	N	9	8	7	6	6	6	9	9	9
		Mediana	59	3,1	0	0	0	0	0	0	0
		Min	21	0	0	0	0	0	0	0	0
		Max	89	21	0	0	0	0	4,6	99	0
		% Control	90,00%	88,89%	87,50%	100,00%	100,00%	100,00%	90,00%	90,00%	90,00%
All	Astrocitoma	N	32	32	32	32	32	32	32	32	32
		Mediana	15,5	0	0	0	0	0	0	0	0
		Min	1,4	0	0	0	0	0	0	0	0
		Max	59	22	6,5	0	7,1	1,6	1	0	45
		% Total	76,19%	78,05%	80,00%	84,21%	84,21%	84,21%	76,19%	76,19%	76,19%
	Control	N	10	9	8	6	6	6	10	10	10
		Mediana	51,5	3,3	0	0	0	0	0	0	0
		Min	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0
		Max	89	21	0	0	0	0	4,6	99	0
		% Total	23,81%	21,95%	20,00%	15,79%	15,79%	15,79%	23,81%	23,81%	23,81%
TOTAL			42	41	40	38	38	38	42	42	42

CAPÍTULO V

V. DISCUSSÃO

No nosso estudo foram detectadas sequências do gene da DNA polimerase de vários HHV nos astrocitomas pilocíticos e nos controlos de cerebelo, com marcada prevalência do EBV, se bem que com um pequeno número de cópias (1-100 cópias por 100ng de DNA). Identificámos sequências virais em 13 tumores (37%) e em 7 controlos (70%). O EBV estava presente em 9 dos 35 astrocitomas (26%) e em 7 controlos (70%).

V.1. Qual é o verdadeiro significado da presença de Herpesvirus nos Astrocitomas? E no Cerebelo?

Nas últimas 3 décadas tem vindo a consolidar-se a ideia de que há uma forte associação entre vírus e o aparecimento de tumores malignos humanos (Damania, 2007).

Os primeiros dados experimentais sugerindo que tumores animais podiam ser provocados por agentes infecciosos foram publicados no início do século xx. No entanto a carcinogénese viral era aceite com cepticismo e só na década de cinquenta é que se comprovou que o EBV estava nas células do linfoma de Burkitt (Oliveira, 2007). Actualmente, existe um grupo conhecido de vírus DNA na população humana, que comprovadamente origina o cancro: dois Herpesvirus - o EBV e o HHV8 ou vírus do sarcoma de Kaposi, o vírus da Hepatite B, o papilomavírus e os poliomavírus.

Vários estudos relataram a expressão de sequências de DNA de proteínas virais em tumores do SNC. Vários grupos pesquisaram a

presença do SV40 (Martini et al., 1996; White e Khalili, 2004), JCV (White et al., 2005) e CMV (Cobbs et al., 2002), em tumores cerebrais e encontraram dados muito divergentes (Lau et al., 2005; Poltermann et al., 2006).

No nosso estudo, o EBV está presente na maioria dos controles (70%) e em 26% dos tumores, contrariando de certa forma, as nossas expectativas iniciais, relativamente à presença dos Herpesvirus neurotrópicos. O HSV1 estava apenas num controlo e num astrocitoma pineal; o HSV2 foi identificado num único controlo de cerebelo e o VZV estava em 2 astrocitomas (Kleinschmidt-DeMasters e Gilden, 2001).

Não se identificaram outros HHV nos restantes controlos.

Nos astrocitomas foram identificadas uma amostra com CMV, outra com HHV7 e finalmente mais uma com HHV8 (HSKV).

A localização classicamente reportada dos HHV neurotrópicos, na fase latente, seria nos gânglios sensoriais e não no cerebelo ou nos tumores (Whitley e Roizman, 2001). A sua presença nestas localizações extra-ganglionares, embora de forma muito mais discreta do que a do EBV, não deixa todavia de ser surpreendente e inquietante (Prober, 2005).

Será que estes vírus sendo latentes têm cópias dispersas pelo SNC (pelo menos da sua DNA polimerase) e são mais ubiquitários do que se possa imaginar (Kleinschmidt-DeMasters e Gilden, 2001)? Será que, agindo à semelhança dos poliomavírus, podem também estar presentes nos respectivos controlos (White e Khalili, 2004) e interferir, ao longo do tempo, em processos cerebrais.

Na última década, a utilização progressiva de técnicas como a imunohistoquímica, a hibridação *in situ* e a PCR, permitiu desvendar não só um espectro cada vez mais alargado de infeções do SNC, por Herpesvirus mas também a sua presença em indivíduos saudáveis (Luppi et al., 1994). Anteriormente, estes vírus eram dificilmente identificáveis, dadas as dificuldades na cultura e isolamento destes vírus (Kleinschmidt-DeMasters e Gilden, 2001).

É curiosa também a presença do HHV2 numa amostra de controlo de cerebello de um indivíduo de 60 anos, em simultâneo com o EBV. Recentemente foi descrito um caso de meningite recorrente causada pelo HHV2 (Ellerin et al. 2004).

A presença no SNC, em regime de permanência, poderia assim explicar o envolvimento fulminante destes vírus, por vezes de forma aparentemente inexplicável, nos processos de encefalite, Síndrome de Guillain-Barré, mielites e até eventualmente nos tumores.

É interessante notar que em dois dos doentes com astrocitoma e em dois dos controlos foram identificados dois Herpesvirus diferentes na mesma amostra, o HHV1 e o CMV num dos astrocitomas e o VZV e o HHV8 noutro astrocitoma. Num dos controlos foi identificado o HHV1 e o EBV e no outro controlo foi o HHV2 e o EBV.

Curiosamente, em todos os casos, um dos vírus identificado é neurotrópico. Esta ocorrência torna-se muito interessante já que parece tratar-se de um mecanismo viral frequentemente utilizado pelos HHV (Doniger et al., 1999). Existem genes virais responsáveis pela transactivação (Vieira et al., 2001) quer doutros Herpesvirus quer doutros vírus, nomeadamente o HIV. Este tipo de interligação que foi referido por Oliveira (2007), com a sugestiva denominação de “ligações perigosas”, existe, para além do factor facilitador da imunossupressão induzida pelo HIV (Prévot et al., 1994; Leach et al., 2002).

Este fenómeno tinha sido suspeitado desde há várias décadas, devido à existência de serologias simultaneamente positivas para mais de um HHV durante a infecção (Irving et al., 1990; Linde et al., 1990; Sanchez-Echaniz et al., 1996).

Não encontramos justificação para o facto do HHV6 ser o único HHV que não foi encontrado nas amostras cerebrais. Dado o seu linfotropismo T, a sua presença no sangue seria talvez mais provável (Hermouet et al., 2003). Relativamente ao HHV6A, a sua ausência poderia explicar-se em parte pela sua menor prevalência na população europeia, ficando contudo por explicar a razão da ausência do HHV6

B, altamente prevalente naquela população (Luppi et al., 1994; Zerr et al., 2005). O relativo neurotropismo deste vírus seria, ao invés também, um factor eventualmente favorecedor da sua presença (Kleinschmidt-DeMasters e Gilden, 2001; Yoshikawa et al., 2001; Prober, 2005).

As idades dos indivíduos de controlo, que faleceram por causas não tumorais nem infecciosas, são bastante mais avançadas do que as dos indivíduos com astrocitoma, dadas as dificuldades na obtenção deste tipo de amostras. Poderia especular-se que a presença do EBV em 70% dos controlos, poderia dever-se a uma média de idades mais elevada, já que este vírus pode ressurgir nos indivíduos mais idosos, na fase final da vida, associado à diminuição progressiva da imunidade. Contudo, tal não foi o caso pois os controlos EBV positivos distribuíram-se por todas as idades de forma relativamente homogénea.

A presença de níveis percentualmente mais elevados de EBV, nos controlos relativamente aos tumores, poderia ser explicada pela perda progressiva das sequências virais, ao longo da progressão tumoral. Um modelo de “*hit and run*” tem sido sugerido e foi confirmado claramente em relação ao papilomavírus humano, no cancro do colo do útero, por Zur Hausen (2000).

Apesar de nos objectivos iniciais se ter colocado a hipótese de se investigarem os HHV neurotrópicos, nos astrocitomas, a possibilidade de investigar a presença de todos os outros Herpesvirus foi decisiva e uma feliz oportunidade, pois permitiu verificar a presença do EBV, que de outra forma nos teria escapado.

Contudo, se reflectirmos um pouco, e apesar do seu linfotropismo B de base, o facto de se ter encontrado o EBV em muitas das amostras, poderá ser um achado até mais lógico, à luz do seu elevadíssimo e comprovado potencial oncogénico e, da sua não negligenciável afinidade para o SNC (Kleinschmidt-De Masters et al., 2001). É de lembrar o linfoma primário do EBV nos indivíduos imuno-deprimidos, que é de localização cerebral (Zhang et al., 2004;

Snanoudj et al., 2003; Higuchi et al., 2005), parecendo assim existir uma ligação preferencial, entre EBV e o SNC.

O EBV está definitivamente associado a neoplasias linfóides e epiteliais com base em estudos epidemiológicos, serológicos e moleculares - linfoma de Burkitt, carcinoma da nasofaringe (Lin et al., 2004), linfomas póstransplante, **linfoma primário do SNC**, subgrupo de doença de Hodgkin post EBV, leiomiosarcoma (McClain et al., 1995; Long et al., 2005), sendo o seu envolvimento suspeitado em muitas outras patologias, nomeadamente no carcinoma gástrico e da mama e na esclerose múltipla (Young et al., 1989; Macsween e Crawford, 2003; Tselis e Jenson, 2006; Thorley-Lawson e Gross, 2004).

De acordo com alguns autores (Cohen et al., 2000; Hjalgrim et al., 2003; Hermouet et al., 2003), a positividade para o EBV, detectada pela sensível técnica de PCR utilizada no estudo, poderia eventualmente corresponder à sua presença nos linfócitos de memória EBV positivos circulantes no SNC (Strik et al., 2004). O EBV está presente em 10^4 - 10^6 células B (Anthony et al., 2003).

Ainda que assim seja, esta localização nos linfócitos B, não exclui, por si só, a sua eventual patogenicidade, particularmente em situações de oportunismo imunológico ou em associação a cofactor genético ou ambiental proliferativo. As células B infectadas pelo EBV originam o estabelecimento de linha celular imortalizada em cultura e a sua capacidade de transformação e oncogénese é determinada por algumas proteínas virais como a LMP1, LMP2, EBNA2 e 3, associada a interferência na apoptose (análogo da bcl-2), modulação do microambiente TH (análogo da IL10) e subversão imunológica (análogo do Complemento), por fenómenos de “pirataria molecular” (Oliveira, 2007), mimetizando proteínas celulares chaves.

Apesar de cada vírus apresentar características particulares, assiste-se a uma clarificação progressiva relativamente à forma como eles interferem em múltiplas vias celulares, dando origem ao processo

tumoral, actuando provavelmente em conjugação com outros cofactores eventualmente necessários ao processo.

A investigação deste tipo de vírus muito tem contribuído para a compreensão actual das moléculas chaves do processo de transformação maligna em geral.

O significado (Damania, 2007) da presença de sequências virais nos tecidos cerebrais pode corresponder a 1 de 2 possibilidades:

- Pode reflectir o envolvimento destes vírus no desenvolvimento dos tumores ou
- Pode reflectir o tropismo aumentado destes vírus para as células de origem glial.

Se o vírus tem um papel causal ou accidental, tem sido, assim, motivo para longos debates.

V.2. A que critérios obedece a eventual atribuição de causalidade oncogénica?

De acordo com Pagano et al. (2004), os critérios actuais mais utilizados para determinar a causalidade oncogénica são:

- 1) Consistência da associação quer epidemiológica quer a nível molecular.
- 2) Oncogenicidade em modelos animais ou cultura de células.

No entanto a utilização do **primeiro** critério não é fácil nem linear. A nível epidemiológico, o facto da infecção inicial, muitas vezes sub clínica, poder ocorrer vários anos ou mesmo décadas antes da eclosão do tumor, com um período de incubação muito longo, dificulta a interpretação deste tipo de dados (White e Khalili, 2004). A nível molecular, a variabilidade de actuação destes agentes infecciosos latentes também confunde os investigadores. Por exemplo, embora a maioria dos vírus reconhecidamente oncogénicos persistam de forma integrada ou sob a forma de episomas, no genoma das células tumorais, tal não acontece no caso do vírus da hepatite B ou C ou mesmo com o *Helicobacter* que agem de forma indirecta ou, como no caso do EBV e o linfoma de Burkitt, e o mesotelioma e o SV40, em que actuam como cofactores.

Em alguns casos esta associação é inconsistente nos vários estudos, como na doença de Hodgkin, no carcinoma gástrico e cancro da mama em relação com o EBV, podendo eventualmente corresponder a pequenos subgrupos, dentro de cada tipo de tumor.

Relativamente à doença de Hodgkin e após profunda controvérsia (Weiss et al., 1989; Pallesen et al., 1991; Grasser et al., 1994), está oficialmente aceite (IARC, 1997) que um subgrupo deste tipo de doença ocorre após a Mononucleose Infecciosa e em relação directa causal com o EBV (Hjalgrim et al., 2003; Timms et al., 2003; Kim et al., 2004).

Relativamente ao carcinoma gástrico e ao cancro da mama prevalecem profundas dúvidas, como veremos adiante (Krieger et al., 2003).

O **segundo** item dos critérios de Pagano está amplamente comprovado para vários Herpesvirus, nomeadamente β e γ Herpesvirus (Long et al., 2005; Luo e Fortunato, 2007). No entanto, o facto de se verificarem efeitos oncogénicos em culturas de células e em modelos animais não significa que sejam obrigatoriamente oncogénicos *in vivo*. Tal é o caso do Adenovírus, que sendo extremamente oncogénico em cultura de células, não está aparentemente na origem de nenhum tumor conhecido (Damania, 2007).

Os postulados de Koch, de utilização quase matemática, em relação às infecções agudas, já não podem, assim, servir como critério de causalidade nas infecções latentes e ubiquitárias.

O facto de estes agentes serem ubiquitários não exclui todavia o seu envolvimento causal, como foi comprovado com o *Helicobacter pilory* que, sendo uma bactéria comensal, está na origem da úlcera gástrica (Drexler, 2002).

Globalmente, os Herpesvirus evoluíram, revertendo os mecanismos de defesa a seu favor, para estabelecer uma infecção permanente (Trgovcich et al., 2002). A capacidade que têm de iludir por um lado o Sistema Imunológico e por outro de interferir no ciclo celular e apoptose, identifica-os naturalmente como potenciais carcinógenos.

Estamos agora a começar a compreender como é que estes vírus persistem *in vivo* e este conhecimento pode ajudar-nos a compreender a origem das doenças associadas e a sua eventual terapêutica e prevenção.

No nosso estudo confirmou-se que os HHV estão no SNC. Por outro lado sabemos que têm a maquinaria biomolecular para causar proliferação celular. Se ao longo do percurso se associarem outros estímulos à proliferação...

Contudo é de ressaltar o conceito de que estes vírus desenvolveram estratégias para minimizar a sua patogenicidade, mantendo, no seu próprio interesse, a sobrevivência do hospedeiro em que ele próprio persiste.

Para finalizar, não podemos todavia deixar de considerar a hipótese dos Herpesvirus estarem, por puro acaso, no cerebelo e, de forma totalmente inocente, nos astrocitomas, tratando-se de meros espectadores ou passageiros da célula, tratando-se de um mero epifenómeno...

Parece-me contudo mandatório tentar validar correctamente eventuais ligações causais suspeitas entre vírus e tumores, o que, como tem vindo a ser descrito, não é tarefa fácil.

Determinar a causalidade deste tipo de agentes infecciosos requer assim, por um lado, um elevado nível de suspeição e por outro, grande ponderação.

V.3. Existirão agentes infecciosos ainda não descobertos?

Os cancros provocados por agentes infecciosos conhecidos atingem já os 20%, sendo provável que mais vírus, conhecidos ou ainda por identificar, (Osterholm, 2000; Wang e Sugden, 2004) venham a ser implicados em processos moleculares oncogénicos (Pagano et al. 2004).

O HHV8 foi identificado no final da última década por Cesarman e colegas (1995), como agente etiológico do sarcoma de Kaposi (Osterholm, 2000).

Os poliomavírus são pequenos vírus DNA que originam tumores. O arquétipo dos poliomavírus é o SV40 (*Simian Vacuolating Virus*) descoberto em 1960 por Sweet e Hilleman e que ganhou notoriedade por ter entrado na população humana através de vacinas da polio contaminadas (cultivadas em células de macaco). Em 1971, dois novos poliomavírus foram descobertos, o BKV (BK vírus) e o JCV (JC vírus) cujas iniciais correspondem aos nomes dos primeiros doentes em que foram identificados. O BKV é o agente etiológico da nefropatia associada ao poliomavírus que ocorre após o transplante renal. O JCV é um vírus ubiquitário e neurotrópico e é o agente etiológico da leucoencefalopatia progressiva que é uma doença desmielinizante fatal do SNC que ocorre nos doentes com SIDA, existindo múltiplos estudos que revelam uma forte associação deste vírus com tumores cerebrais (White et al., 2005)

O seu genoma codifica apenas 6 proteínas, três das quais - o antígeno T, o antígeno t e a agnoproteína - parecem ter elevada capacidade transformadora quer *in vitro*, quer *in vivo*.

Foi no sentido de pesquisar a presença de um **novo Herpesvirus** desconhecido que realizámos a técnica de CODEHOP que, à semelhança de outros autores, que identificaram com esta técnica novos Herpesvirus, como o Herpesvirus bovino linfotrópico (HBL) associado a linfocitose persistente nos bovinos, um novo α -Herpesvirus

das tartarugas marinhas associado a fibropapilomatose das mesmas e dois homólogos do HHV8, associados a fibromatose peritoneal de diferentes espécies de macacos (Van Devanter et al., 1996; Rose et al., 1997, 1998; Casey, 1998; Quackenbush et al., 1998), poderia permitir detectar esta eventual presença nos astrocitomas. O nosso estudo permitiu excluir essa possibilidade, não tendo sido identificado nenhum Herpesvirus novo, eventualmente envolvido na patogénese dos astrocitomas pilocíticos.

V.4. Porque existe uma tão grande variabilidade nos resultados de diferentes estudos?

Estudos que tentam relacionar alguns vírus com diversa patologia tumoral variada, conduzem frequentemente a resultados contraditórios conforme os diferentes autores. Alguns estudos mostram clara evidência molecular do genoma viral, contudo outros estudos, realizados com técnicas aparentemente semelhantes, não confirmam esta mesma presença molecular ou imunohistoquímica.

A presença de vírus foi investigada em várias **doenças hematológicas** por vários autores já que alguns vírus foram confirmados como causadores de linfomas e leucémias (vide Tabela 1- Capítulo I).

A evidência de uma possível causa infecciosa para a leucemia infantil provém de dados epidemiológicos. Existem grandes variações na incidência de país para país e em concordância com diferentes factores epidemiológicos, como por exemplo, a mobilidade e a mistura das populações (Kinlen e Balkwill, 2001). Outra particularidade, relaciona-se com a maior incidência (15 a 20%) em comunidades com nível de vida mais elevado - Teoria Higienista (Krieger et al., 2003), podendo também ser relacionado com uma mais tardia exposição e uma resposta imunológica desregulada, como pode ocorrer na mononucleose infecciosa. Os factores de susceptibilidade genéticos também estão envolvidos, dada a diferente distribuição pelos haplótipos HLA (Mackenzie et al., 2001).

No estudo de Hermouet (2003), no qual tive oportunidade de colaborar, foi pesquisada a presença de todos os HHV, em leucémias linfocíticas e linfoblásticas de células B e no mieloma múltiplo. O EBV estava presente na maioria das amostras de dadores saudáveis e dos pacientes com leucemia mas não nos mielomas múltiplo (MM). O HHV6 A foi identificado em 44 a 52% das amostras das leucémias e o HHV8 estava presente em 18,8 a 28,6% destes mesmos pacientes e ambos também praticamente ausente nos doentes com MM. O HHV6

B e o HHV7 estavam praticamente ausentes. O CMV estava presente em 75% das amostras de leucémia linfoblástica aguda e menos presente nos restantes doentes. Contudo, na maioria dos casos, o nº de cópias (< 100 cópias/100 ng DNA) foi aparentemente insuficiente para confirmar a sua causalidade, à excepção de um dos casos, de doença fulminante, que foi relatado mais tarde no NEJM, de infecção pelo HCV associada à do HHV8 (Hermouet et al., 2003, 2003). O HHV8 tem vindo a ser progressivamente associado à linhagem de células plasmocitárias (Duprez et al., 2004; Wang e Sugden, 2004).

A detecção e quantificação de HHV em leucémias linfoblásticas agudas (LLA) também foi realizada por Mackenzie e colegas (2001). Neste estudo foram pesquisados quatro HHV (EBV, HHV6, HHV7, HHV8). Foram detectados quer nos controlos quer nas leucémias, em níveis muito baixos (1-100 cópias/100 ng DNA) o que embora exclua o seu envolvimento directo como agentes transformadores, não exclui todavia, dada a sua presença, uma intervenção indirecta. Os resultados específicos para cada HHV diferem muito contudo do estudo de Hermouet. O EBV foi identificado em apenas 6 dos 28 controlos e em 5 dos 27 doentes com LLA, o HHV6 foi detectado numa única amostra de LLA, o HHV7 estava mais presente, em 7 dos 27 com LLA e em 9 dos 28 controlos e o HHV8 foi identificado, neste estudo, apenas num doente com LLA. De referir que seis amostras foram positivas para 2 HHV em simultâneo.

A variabilidade dos resultados ocorre também no caso dos Herpesvirus (Cobbs et al., 2002; Lau et al., 2005; Polterman et al., 2006; Scheurer et al., 2007) e dos Poliomavírus (White e Khalili, 2004; Okamoto et al., 2005; Muñoz-Marmol et al., 2006) em relação **aos tumores cerebrais.**

Esta problemática contradicção foi revista recentemente por Garcea e Imperiale, (2003) e parece relacionar-se com a qualidade do aparelho de qPCR utilizado e o número de ciclos de PCR efectuados, na amplificação do DNA, sendo necessário um maior nº de ciclos (40-60) para detectar um pequeno número de cópias virais por célula.

Poderia também depender das sequências virais seleccionadas, para cada estudo, e que apenas alguns genes virais, potencialmente os mais oncogénicos, estivessem presentes em determinada fase do tumor.

Em relação à técnica de Imunohistoquímica, as dificuldades encontradas parecem relacionar-se com a diferente especificidade dos anticorpos utilizados.

Um grupo (Cobbs et al., 2002) implicou o CMV na patogénese dos gliomas malignos, tendo este vírus sido detectado também nos carcinomas do cólon (Harkins et al., 2002) e da próstata (Samantha et al., 2003).

Os nossos resultados diferem em vários aspectos dos de Cobbs, nomeadamente em relação à elevada percentagem de CMV relatada por Cobbs nos gliomas e à sua total ausência nos controlos (Ribalta et al., 2002). No nosso estudo não foi possível confirmar estes resultados tão positivos relativamente ao CMV já que este foi encontrado apenas num astrocitoma pilocítico pineal. Nos nossos astrocitomas encontrámos também outros HHV, ausentes no trabalho de Cobbs. O astrocitoma pilocítico, mais frequente num grupo etário mais jovem, com baixo grau de malignidade e com localização preferencial no cerebelo, confere um cariz particular ao nosso estudo. O tipo de tumor estudado por nós constitui assim um subgrupo com comportamento bem diferente do agressivo glioma maligno cerebral estudado por Cobbs.

Será que estas diferenças se poderiam relacionar com o facto de poderem ocorrer apenas em pequenos subgrupos clínicos, à semelhança do que ocorre em relação à doença de Hodgkin pós-MNI que foi tão difícil de aceitar (Weiss et al., 1989, Grasser et al., 1994; Thorley-Lawson e Gross, 2004)?

Não foi possível também a outros autores reproduzir estes resultados de Cobbs (Brouchet et al., 2005; Lau et al., 2005; Polterman et al., 2006; Scheurer et al., 2007).

Estudos serológicos efectuados em adultos com glioma concluíram que existia uma associação inversa entre a presença de anticorpos

contra o VZV e o EBV e os tumores cerebrais. Verificou-se também que era ligeiramente mais provável ter anticorpos para o HSV e CMV do que contra o VZV e o EBV (Wrensch et al., 1997, 2001).

Os resultados discrepantes encontrados pelos diversos autores podiam em parte ser explicados também pela variação da prevalência geográfica.

Do ponto de vista epidemiológico, a variação na positividade entre os estudos poderia estar relacionada com variações da prevalência como é bem reconhecida em certas neoplasias associadas ao EBV- o tumor de Burkitt em África (Rossi e Bonetti, 2004) e o carcinoma da nasofaringe no sul da China (Ohashi et al., 1996; Lin et al., 2005). O EBV foi identificado no cancro da mama em certas zonas da Europa (Labrecque et al, 1995; Bonnet et al, 1999) enquanto outros estudos, nomeadamente americanos (Glaser et al, 1998; Chu et al., 2001) relatavam a sua total ausência nas amostras.

Na realidade, os nossos resultados não permitem estabelecer uma relação causal entre a infecção viral latente e os astrocitomas pilocíticos. No entanto, embora o tamanho da amostra seja pequeno e as cargas virais detectadas sejam muito baixas, o facto de se terem detectado sequências de HHV não só nos astrocitomas mas também nos controlos de cerebelo, vem sem dúvida enriquecer a controvérsia sobre um eventual papel dos vírus na oncogénese humana, particularmente na neuro-oncogénese.

Em conclusão, o EBV foi o HHV mais frequentemente identificado nos astrocitomas embora com níveis aparentemente demasiado baixos para serem responsáveis pela indução do tumor. O verdadeiro significado da sua presença ou ausência é difícil de avaliar.

Neste trabalho pretendemos apenas contribuir modestamente, com carácter exploratório, para a compreensão da natureza dos fenómenos

imunobiológicos que envolvem células e vírus desde há milhões de anos.

Perspectivas futuras: Serão sem dúvida necessários mais estudos moleculares e epidemiológicos, no sentido de tentar validar eventuais ligações causais suspeitas entre vírus e tumores.

Uma forma de abordagem interessante começa agora a tomar forma. Passa-se agora a tentar comprovar o envolvimento directo das proteínas virais ou dos seus homólogos - como a BZLF-1 (Adamson, 2005), o IRF 7 (Zhang et al., 2004) e o bcl-2 (Camilleri-Broet et al., 2000; Kim et al., 2004), nos tumores relacionados com o EBV ou o envolvimento directo do antígeno T nos tumores relacionados com os poliomavírus (Dell Valle et al., 2001).

Ficam assim em aberto múltiplas questões que poderão constituir vias de investigação futura nesta área.

CAPÍTULO VI

VI. CONCLUSÕES

O nosso estudo detectou um pequeno número de cópias de sequências de DNA de Herpesvirus (HHV), do gene da DNA polimerase viral, em astrocitomas pilocíticos e em amostras de controle de cerebelo. Os nossos resultados de PCR quantitativa revelaram a presença de todos os HHV, com excepção do HHV6 que se encontrava ausente nas amostras. Identificámos sequências virais em 13 tumores (37%) e em 7 controles (70%). O EBV estava presente em 9 dos 35 astrocitomas (26%) e em 7 controles (70%).

A presença simultânea de dois HHV na mesma amostra (HHV1/CMV e VVZ/HHV8 em 2 astrocitomas e HHV1/EBV e HHV2/EBV em 2 controles) é interessante, mas não verdadeiramente surpreendente, uma vez que os vírus e em particular os HHV podem transactivar-se mutuamente.

A negatividade da técnica de CODEHOP permite excluir a presença de um novo HHV eventualmente envolvido na neuro-oncogénese deste tipo de tumor.

Após a infecção inicial, o EBV persiste durante toda a vida do indivíduo, nos linfócitos B pelo que, o número de cópias encontradas pode na realidade corresponder à sua detecção neste reservatório, sendo difícil excluir que o vírus possa ser apenas um passageiro inconsequente nos tumores analisados. No entanto, o EBV nos linfócitos, mantém a sua patogenicidade, sendo de relembrar, o linfoma primário do Sistema Nervoso Central, causado pelo EBV nos imunodeprimidos.

O facto de alguns agentes infecciosos serem ubiqüitários, torna difícil a interpretação relativamente à sua presença.

Um grupo (Cobbs et al., 2002) implicou o CMV na patogénese dos gliomas malignos. Não foi possível noutros estudos, nomeadamente no nosso, reproduzir os resultados do grupo de Cobbs.

Do ponto de vista epidemiológico, a variação na positividade entre os estudos poderia eventualmente estar relacionada com variações da prevalência geográfica.

Variações num subgrupo particular do tumor podem também tornar complexa a confirmação de um agente etiológico viral.

Abordagens metodológicas diferentes poderiam também explicar os diferentes resultados.

Dado que o processo de génese tumoral é um processo progressivo (*multistep*) que ocorre através de um longo período de tempo e em que múltiplos factores podem estar envolvidos (*multi-hit*), é virtualmente impossível saber até que ponto o fenótipo celular ou viral final, se relaciona com um eventual precursor infeccioso, que pode inclusivé ter-se perdido durante o processo (*hit and run*).

Em conclusão, o EBV foi o Herpesvirus mais frequentemente identificado nos astrocitomas, embora com níveis aparentemente demasiado baixos, para serem responsáveis pela indução do tumor. O verdadeiro significado da sua presença é, à luz do conhecimento actual, difícil de interpretar.

Serão sem dúvida necessários mais estudos moleculares e epidemiológicos, ficando em aberto múltiplas questões que poderão constituir vias de investigação futura nesta área.

*“Tenho algumas regras que me ensinaram muito do que sei:
O Quê?, Porquê?, Quando?, Como?, Onde?, E Quem?”*

Kipling

APÊNDICE

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainresBRAIN
RESEARCH

Research Report

Detection and quantitative analysis of human herpesvirus in pilocytic astrocytoma

Ana M. Neves^{a,b,c,*}, Gertrude Thompson^d, Júlio Carnevalheira^d, José Costa Trindade^c, José Rueff^b, Joaquim Machado Caetano^b, James W. Casey^a, Sylvie Hermouet^{a,e}^aDepartment of Microbiology and Immunology, Cornell University, Ithaca, NY, USA^bDepartment of Immunology and Genetics, College of Medical Sciences, New University, Lisbon, Portugal^cDepartment of Pediatrics, Medical School, Lisbon University, Portugal^dInstituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), Porto University, Portugal^eInserm UMR 892, Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 5 May 2008

Available online 15 May 2008

Keywords:

Human herpesvirus
Pilocytic astrocytoma
Real-time quantitative polymerase
chain reaction (qPCR)
Viral DNA polymerase
PCR with consensus-degenerate
hybrid oligonucleotide
primers (CODEHOP)

ABSTRACT

We investigated the hypothetical role of human herpesviruses (HHVs) in tumour formation of the cerebellum. Thirty-five samples of pilocytic astrocytoma and 10 control samples of cerebellum from patients who died of unrelated diseases were examined. Presence of the 8 known HHVs was first studied using specific real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) targeting viral DNA polymerase. HHV's DNA polymerase was found present in 20 samples (7 controls, 13 astrocytomas) and was absent in 25 samples (3 controls, 22 astrocytomas). DNA polymerase of Epstein-Barr Virus (EBV) was present in 16 samples, 7/10 controls (70%) and 9/35 astrocytomas (26%). HHV-1 and Varicella-Zoster virus were detected only twice and HHV-2, Cytomegalovirus, HHV-7 and HHV-8, only once. HHV-6 was not detected. In all cases, the gene copy numbers of DNA polymerase were low (<100/100 ng DNA). A second approach was to search for novel HHVs, using consensus-degenerated hybrid oligonucleotide primers (CODEHOP) PCR: no sequence indicative of a new HHV was detected. In summary, EBV was the most frequent HHV detected in pilocytic astrocytoma, but at very low levels. According to the actually accepted threshold the results suggest that EBV cannot be considered responsible for tumorigenesis of pilocytic astrocytoma.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Viral infection can contribute to the development of human cancer. Several DNA viruses are implicated: human papillomavirus (HPV), Epstein-Barr virus (EBV) and human herpesvirus 8 (HHV-8) are now recognised as oncogenic and associated with specific tumours (Ambinder, 2003; Cesarman, 2003; Drexler, 2002; Kurzrock and Talpaz, 1999; Pagano et al.,

2004; Tselis and Jenson, 2006; zur Hausen, 2000). Viral genes may play a role primarily or exclusively in the early stages of transformation: indeed, by the time infected cells have become malignant, only a subset of viral genes are expressed (Crum, 2002; Kurzrock and Talpaz, 1999; zur Hausen, 2000).

Although virus-associated tumours in animals have provided molecular insights (Casey, 1998; Quackenbush et al., 1998), the mechanisms underlying virus-associated

* Corresponding author. Department of Pediatrics, University Hospital of Santa Maria, Av Professor Egas Moniz, 1699-Lisbon, Portugal.

Fax: +351 217805637.

E-mail address: amneves@hotmail.com (A.M. Neves).0006-8993/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.brainres.2008.05.009

malignancy in humans are poorly understood. Several HHVs are responsible for infections widely spread in the general population. Exposure occurs in childhood or young adulthood and leads to lifelong persistence of the virus (Becher, 2002; Crumpacker, 2004; Ellerlin et al., 2004; Kleinschmidt-DeMasters and Gilden, 2001; Prober, 2005). HHVs are recognized for their neuro- and lympho-tropism. Human herpes-simplex virus 1 and 2 (HHV-1, HHV-2) and Varicella-Zoster virus (VZV) in particular are neurotropic viruses and it is accepted that they remain in sensory ganglia throughout life (Douglas et al., 2003; Hill et al., 2005; Kleinschmidt-DeMasters and Gilden, 2001; Whitley and Roizman, 2001). In children, varicella can be complicated by cerebellar ataxia, suggesting that the virus may be associated with later development of cerebellum tumours (Weller, 1983; Wrensch et al., 1997, 2001). Although not recognised as oncogenic, human cytomegalovirus (CMV) has been incriminated in the pathogenesis of malignant gliomas (Cobbs et al., 2002; Doniger et al., 1999; Lau et al., 2005). In contrast, EBV and HHV-8 are clearly associated with human cancer (Ambinder, 2003; Cesarman, 2003; Cohen, 2000; Flore, 2004; IARC, 1997). In latency, both promote survival of infected cells (Chang et al., 1994; Duprez et al., 2004; Grundhoff and Ganem, 2004; Lan et al., 2005; McClain et al., 1995; Macsween and Crawford, 2003; Prévot et al., 1994; Rossi and Bonetti, 2004; Thorley-Lawson and Gross, 2004; Tselis and Jensen, 2006) and primary brain lymphoma caused by EBV is established in HIV-infected and post-transplant patients (Snanoudj et al., 2003; Zhang et al., 2004). The etiology of brain tumours remains largely unknown. Genetic and environmental factors are generally accepted as etiologic factors (Lau et al., 2005; Muñoz-Marmol et al., 2006). The role of viral infections, by CMV, human neurotropic polyomavirus JC virus (JCV), or SV40 has been documented but there are still discrepancies among authors (Cobbs et al., 2002; Martini et al., 1996; Muñoz-Marmol et al., 2006; Wang and Sugden, 2004). Pilocytic astrocytoma of the cerebellum is one of the most common brain tumours in children, adolescents and young adults, with an excellent prognosis after complete resection. It is generally accepted that astrocyte proliferation occurs after injury, for instance viral infection (Evans et al., 2003).

In this study we addressed the question of the viral aetiology of pilocytic astrocytoma of cerebellum by using two polymerase chain reaction (PCR) techniques, one specific and quantitative, the second using consensus-degenerated hybrid oligonucleotide primers (CODEHOP), to detect sequences of the herpesvirus DNA Polymerase genes (Hermouet et al., 2003; Rose et al., 1997, 1998; Van Devanter et al., 1996). Brain biopsies of ten controls and thirty-five pilocytic astrocytoma were examined.

2. Results

HHV polymerase DNA was detected in 13 astrocytoma (13/35) and 7 controls (7/10). The viral load found for each HHV in controls and tumour samples is described in Table 1. EBV was the most frequent HHV identified, present in 9 of the 35 astrocytoma (26%) and in 7 controls (70%). EBV is widely spread in the general population (>90% of sero-prevalence) with virtually all exposures occurring in childhood or young adult-

hood, persisting for the lifetime of the person, particularly in B lymphocytes (Anthony et al., 2003; Cohen, 2000; Hjalgrim et al., 2003; Kleinschmidt-DeMasters and Gilden, 2001; Macsween and Crawford, 2003; Krieger et al., 2003). Thus, one cannot exclude that the EBV positivity of brain samples might be due to B-lymphocytes from blood vessels. Using immunohistochemistry (IHC), no EBV immuno-reactivity was detected in positive EBV tumour and control samples by qPCR, with the antibodies used (not shown). However, being a much less sensitive method than qPCR, negative immuno-histochemistry results were not surprising since EBV loads were low.

HHV-1 was present in 1 pineal brain tumour. HHV-1 and 2 were also present in 2 controls. VZV was present in 2 neoplasms and absent in controls. CMV, HHV-7 and HHV-8 were present in 3 tumours and absent from control samples. HHV-6 was not detected. In 4 samples, 2 HHV (HHV-1/EBV, HHV-1/CMV, HHV-2/EBV and VZV/HHV-8) were simultaneously detected. All positive samples showed low levels of copies of viral DNA polymerase (1–100 copies/100ng DNA); this was true for all HHVs.

In addition, we used PCR with consensus-degenerated hybrid oligonucleotide primers (CODEHOP) to look for novel HHVs in all HHVs negative samples: Two samples with EBV sequences were amplified but no sequence indicative of a new HHV was detected.

3. Discussion

In recent years several studies have reported the presence of various viral DNA sequences or proteins in brain tumours. In particular, several groups have examined brain tumours for evidence of SV40, JCV and CMV and reported widely divergent findings (Cobbs et al., 2002; Lau et al., 2005; Martini et al., 1996; Muñoz-Marmol et al., 2006; Ribalta et al., 2002). Reasons for these discordant findings may be the sensitivity of the PCR techniques used and the difficulty to work with paraffin-embedded tissues. In the present study, we used highly sensitive quantitative PCRs, which have the additional advantage of amplicons of sizes sufficiently small (<120 bp) not to be affected by eventual DNA degradation in paraffin. In these conditions, like other groups (Cobbs et al., 2002) we found the presence of HHVs in the cerebellum; moreover, the detection in the same sample of 2 HHVs occurred in 4 cases (2 tumour samples and 2 controls). This may not be so surprising since HHVs can transactivate each other (Doniger et al., 1999; Vieira et al., 2001). However, based on the assumption that at least one viral genome copy per host cell should be present to implicate a given virus in tumorigenesis, the viral loads found in brain tumours are too low for HHVs to be directly responsible for tumour induction.

EBV is clearly associated to both lymphoid and epithelial neoplasms on the basis of epidemiological, serological and molecular data and its involvement is suspected in Burkitt's and Hodgkin's lymphoma, post-transplant lymphoproliferative disease, primary lymphoma of the central nervous system (CNS), nasopharyngeal carcinoma and recently, breast cancer (Ambinder, 2003; Bonnet et al., 1999; Bouchet et al., 2005; Cohen, 2000; Hermouet et al., 2003; IARC, 1997; Lin et al., 2004; McClain et al., 1995; Macsween and Crawford, 2003; Pagano

Table 1 – Herpesvirus loads observed in normal brain and in astrocytomas

Patients	Sex	Age	Biopsy	Number of HHV copies/100 ng cellular DNA								
			Localization	HHV-1	HHV-2	VZV	EBV	CMV	HHV-6A	HHV-6B	HHV-7	HHV-8
Controls												
E1	F	7 mo	Cerebellum	0	0	0	7	0	0	nd	nd	nd
E2	F	21 y	Cerebellum	0	0	0	4	0	0	nd	nd	nd
D7	M	29 y	Cerebellum	0	0	0	3	nd	0	0	0	0
D8	M	35 y	Cerebellum	0	0	0	21	0	0	0	0	0
D9	M	44 y	Cerebellum	0	0	0	12	0	0	0	0	0
D12	F	59 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E3	M	60 y	Cerebellum	0	99	0	3	0	0	nd	nd	nd
D10	F	72 y	Cerebellum	0	0	0	nd	0	0	0	0	0
D11	F	77 y	Cerebellum	5	0	0	1	0	0	nd	nd	nd
D6	F	89 y	Cerebellum	0	0	0	0	nd	0	0	0	0
Astrocytomas												
F1	F	1 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G10	M	2 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F9	F	2 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F3	F	3 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F5	F	4 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F3	F	5 y	Cerebellum	0	0	0	7	0	0	0	0	0
F1	F	5 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F8	F	6 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E5	M	6 y	Cerebellum	0	0	3	0	0	0	0	0	2
E11	M	6 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E12	F	8 y	Cerebellum	0	0	0	4	0	0	0	0	0
F2	F	13 y	Cerebellum	0	0	0	7	0	0	0	0	0
F11	M	13 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G1	F	13 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G9	M	14 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G5	F	15 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	M	16 y	Cerebellum	0	0	45	0	0	0	0	0	0
G8	F	16 y	Pineal	1	0	0	0	7	0	0	0	0
E6	M	18 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	F	18 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E4	M	19 y	Cerebellum	0	0	0	22	0	0	0	0	0
F4	M	19 y	Temporal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G3	M	19 y	Parietal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F6	M	20 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F7	M	23 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F12	M	23 y	Lat ventricle	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F4	F	29 y	Cerebellum	0	0	0	4	0	0	0	0	0
E10	M	28 y	Cerebellum	0	0	0	1	0	0	0	0	0
E9	M	30 y	Cerebellum	0	0	0	1	0	0	0	0	0
F10	F	31 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G6	F	52 y	Brain	0	0	0	0	0	0	0	7	0
G7	F	59 y	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G4	na	na	Cerebellum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E7	na	na	Cerebellum	0	0	0	4	0	0	0	0	0
E8	na	na	Cerebellum	0	0	0	94	0	0	0	0	0
nd = not done (not enough material). na = not available. F = female. M = male.												

nd = not done (not enough material).

na = not available.

F = female.

M = male.

et al., 2004; Prévot et al., 1994; Rossi and Bonetti, 2004; Snanoudj et al., 2003; Thorley-Lawson and Gross, 2004; Timms et al., 2003; Tselis and Jensen, 2006; Zhang et al., 2004). In PCR investigations, the PCR products can be generated from bystander infected cells. For example, EBV sequences can be amplified from circulating B-lymphocytes, therefore it is difficult to exclude the possibility that the virus

is simply a passenger in the tumour tissues. However, the presence in malignant tissues of nearly ubiquitous infectious agents such as EBV, does not necessarily exclude the possibility that they play a role in carcinogenesis, as was demonstrated with *Helicobacter pylori*, a commensal bacteria in gastric ulcer (Drexler, 2002; Osterholm, 2000; Pagano et al., 2004). The presence of lower levels of EBV in tumour than in

control samples could be explained if the virus was lost during tumour progression. Such a “hit and run” model has been confirmed in human papilloma viruses (Huang et al., 2004; zur Hausen, 2000).

Regarding CMV, which has been implicated in the pathogenesis of several malignancies (Cobbs et al., 2002; Harkins et al., 2002; Samanta et al., 2003). Cobbs et al. reported that a high percentage of malignant gliomas are infected with CMV (Cobbs et al., 2002): like other groups (Bouchet et al., 2005; Lau et al., 2005), we have not been able to detect CMV in our pilocytic astrocytomas samples except in a single pineal astrocytoma. Discrepant results may be explained by different prevalence depending on geographical location. From an epidemiological point of view, variation between studies may be related to geographical variations of virus prevalence as it is well known in EBV-associated cancers (Kinlen and Balkwill, 2001; Kurzrock and Talpaz, 1999; Tselis and Jensen, 2006). Our tumour and control samples all came from Europe (Portugal). For example, EBV was identified in breast cancer in certain regions of Europe while its absence was reported in American or Taiwanese patients (Bonnet et al., 1999; Chu et al., 2001; Glaser et al., 1998; Labrecque et al., 1995). Different methodological approaches could also explain the divergent results found.

In conclusion, EBV is the most frequent herpesvirus found in pilocytic astrocytoma, but at levels apparently too low to be responsible for tumour induction. Although our sample size was small, the presence of HHVs in pilocytic astrocytomas and cerebellum controls enriches the controversy over their eventual role in human neuro-oncogenesis (Muñoz-Marmol et al., 2006). Further molecular and epidemiological studies are needed to establish a role for HHVs in the pathogenesis of tumours of the cerebellum.

4. Experimental procedures

4.1. Patients and samples

With the approval of the local ethics committee, we studied paraffin-embedded brain tissue biopsies from 35 pilocytic astrocytoma (30 from cerebellum, 5 with other brain locations; mean age of patients: 15.5 years). Most of the astrocytoma (33/35) were of low grade malignancy. Ten cerebellum biopsies from patients (mean age: 51.5 years) who died of unrelated diseases were used as controls.

4.2. DNA preparation

The brain tissue, previously fixed in formol and paraffin-embedded, was submitted to Proteinase K digestion, phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. Genomic DNA was prepared using QIAGEN kits for tissue samples (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and kept at 4°C until use (Wright and Manos, 1990).

4.3. Real-time quantitative PCRs (qPCRs)

Samples were assessed by real-time qPCR amplification of viral DNA polymerase gene of each herpesvirus for the presence and quantification of the viral load of HHV-1, HHV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6 types A and B, HHV-7 and HHV-8 as described elsewhere (Hermouet et al., 2003). Primers and probes specific for an 80–90bp amplicon within the DNA polymerase gene of each HHV were described previously (Hermouet et al., 2003); primers and probes for HHV-1, HHV-2 and VZV are shown in Table 2; qPCRs were performed using the ABI 7700 PCR

Table 2 – Primer and probe sequences for detection of HHV-1, HHV-2 and VZV DNA polymerases and CODEHOP PCR

Primers and probes	Sequence (5'-3')
HHV-1	
Forward primer	GCCTTCATGACCTTGTGAAA
Reverse primer	CGTCAGCTTGGCCAGCAA
6FAM probe	CCGAGTTCGTGACCGGTACAACATC
HHV-2	
Internal standard (fwd)	CTGGCCCTTCATGACCTTCGTCAAGCAGTACGGGCCGAGTTCGTGACCGGTACAACATC
Internal standard (rvs)	ATCTCCGTCAGCTTGGTCAGGACGAGGGCCAGTCGAAGTTGATGATGTTGTACCCGGTC
Forward primer	GCCTTCATGACCTTGTCAAG
Reverse primer	TCCGTCAGCTTGGTCAGGAC
6FAM probe	CCGAGTTCGTGACCGGTACAACATC
VZV	
Internal standard (fwd)	GGTCAAATCCCAACGTTGAGAACGCATCCCTTATGTTATTGCGCCGCCACA
Internal standard (rvs)	AGCTACACTTTTTCATCAGGCTCCACTTCGTCTGTGGGGGCCACAATAACAT
Forward primer	CAAATCCGAACGTTGAGAA
Reverse primer	TACACTTTTGGATCAGCCTCC
6FAM probe	CATCCCTTATGTTATTGTGGCCGAC
CODEHOP HHV Primers	
“DFAS” primer	ATG GTG GTG TTG GAC TTT GCC AGY YTN TAY CC
“DFQS” primer	ATG GTG GTG TTG GAC TTT CAA AGY YTN TAY CC
“TCNAVY” primer	GTA ACG TGC AAC GCG GTG TAC GGN KTN ACN GG
“GDTD” primer	CG GAA CGA CAT AAA CAT GGT GTC NGT RTC NOC RTA

instrument, with TaqMan reagents and fluorescent probes from ABI/Applied BioSystems (Foster City, CA, USA).

Internal standards were made from each HHV DNA polymerase amplicon, amplified from infected cell lines: AA2 for EBV, BCL2 for HHV-8, HSB2/HHV-6 for HHV-6 (AIDS Repository), human fibroblasts for CMV, followed by cloning into TOPO-TA vector (in Vitrogen, Carlsbad, CA, USA). For HHV-1, HHV-2, VZV and HHV-7, internal standards were made by hybridizing two 54-mer oligonucleotides corresponding to HHV-1, HHV-2, VZV or HHV-7 DNA polymerase, followed by PCR amplification with specific primers and cloning into TOPO-TA vector (Hermouet et al., 2003). After verifying each clone by sequencing, DNA preparations of the TOPO-TA constructs containing HHV DNA polymerase amplicons were used as copy number standards for qPCR assays.

The specificity, sensitivity and reproducibility of the qPCR assays were verified using DNA from cells known to be infected with the HHV studied. The qPCR assays thus developed were mono-specific and highly sensitive (<10 copies of HHV DNA in 100 ng cellular DNA) (Hermouet et al., 2003). Quantitative TaqMan PCRs were performed for each of the HHVs listed above on patient and control samples on 100 ng of genomic DNA per reaction. Amplification was performed in triplicate or quadruplicate in reaction volumes of 25 µl for 40 cycles (15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C) (Hermouet et al., 2003). Results are expressed as mean numbers of copies of HHV DNA polymerase per 100 ng of cellular DNA.

4.4. CODEHOP PCR

To reveal novel HHVs, DNA samples found negative for HHVs by qPCR were analysed by CODEHOP PCR with primer pools designed to recognise all HHVs, as described (Hermouet et al., 2003; Rose et al., 1997, 1998; Van Devanter et al., 1996). These primers, shown in Table 2, were modelled on consensus amino acid sequences in the most conserved gene in HHVs, DNA polymerase, with a consensus 5' clamp and a degenerate 3' sequence (Hermouet et al., 2003; Quackenbush et al., 1998; Rose et al., 1997, 1998; Van Devanter et al., 1996). The HHV CODEHOP PCRs were performed on 100 ng of genomic DNA. A semi-nested PCR reaction was performed, using first 100 pmol of either DFAS (gamma and alpha herpesvirus) or DFQS (beta herpesvirus) and GDTD primers (55 °C or 60 °C, 35 cycles). Then, 2% of the PCR reaction was subjected to a second amplification using 100 pmol of TCNAVYV and GDTD primers under the same conditions. The primers were tested on DNA extracted from cells infected with the different HHVs (determined by qPCR). Under the conditions used, the lowest number of viral copies detected with the set of primers DFAS/GDTD and TCNAVYV/GDTD was 10 for EBV, and HHV-8, 100 for CMV and 1000 for HHV-6. Products of CODEHOP PCR directed at amplifying HHV polymerase amplicons were separated on 2.8% agarose gels (the expected sizes of PCR product are approximately 225 bp for HHVs), PCR amplicons of the expected size were purified then cloned into TOPO-TA vector for sequencing. Amplicon sequences were analyzed by comparison to sequences of known viruses available in data banks (NCBI BLAST search) (Hermouet et al., 2003).

4.5. Immunohistochemistry

The samples of astrocytoma and cerebellum controls found positive for EBV were assessed by immunohistochemistry (IHC) with anti-LMP-1 monoclonal antibodies according to the manufacturer's instructions. Slides were counterstained with haematoxylin. One sample from the hospital repository, known to be infected with EBV, was used as positive IHC control.

4.6. Statistical analysis

Kruskal–Wallis Test was used to compare data of different groups of patients. Fisher's exact test was used to compare proportions. A *P* value <0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. Cortez Pimentel, Prof. Bigotte de Almeida, Dr. Manuel Lima, Prof. Manuel Melo Pires of the Hospital of Santa Maria, Garcia da Orta, Egas Moniz (Lisbon) and Hospital of Santo António (Porto), Portugal, for kindly providing the samples. We are also grateful to Dr. Ana Serpa and Dr. Rosário Sanches for technical help and advice. We also thank Mrs. Rufina N. Casey for invaluable support. This research was supported in part by grants from the Gulbenkian and Luso-American Foundations.

General information about the study.

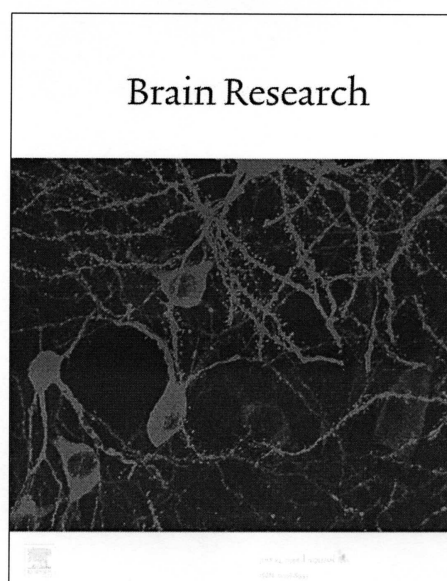
This work is part of a dissertation to be submitted by Ana Neves to the College of Medical Sciences, Lisbon New University, in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor in Philosophy.

REFERENCES

- Ambinder, R., 2003. Infection and lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 349, 1309–1311.
- Anthony, I.C., Crawford, D.H., Bell, J.E., 2003. B lymphocytes in the normal brain: contrasts with HIV-associated lymphoid infiltrates and lymphomas. *Brain* 126, 1058–1067.
- Becher, Y., 2002. Herpes simplex virus evolved to use the human defense mechanisms to establish a lifelong infection in neurons — A review and hypothesis. *Virus Genes* 24, 187–196.
- Bonnet, M., Ginebretiere, J.M., Kremmer, E., Grunewald, V., Benhamou, E., Contesso, G., Joab, I., 1999. Detection of Epstein–Barr in invasive breast cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1376–1381.
- Bouchet, L., Valmary, S., Dahan, M., Didier, A., Gallateau-Salle, F., Brousset, P., Degano, B., 2005. Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *Br. J. Cancer* 92, 743–746.
- Casey, J.W., 1998. Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus. *J. Virol.* 2, 4237–4242.
- Cesarman, E., 2003. Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus—the high cost of viral survival. *N. Engl. J. Med.* 349, 1107–1109.

- Chang, Y., Cesarman, E., Pessins, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., Moore, P.S., 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266, 1865–1869.
- Chu, P.G., Chang, K.L., Chen, Y.Y., Chen, W.G., Weiss, L.M., 2001. No significant association of Epstein-Barr virus infection with invasive breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 159, 571–578.
- Cobbs, C.S., Harkins, L., Samanta, M., Gillespie, G.Y., Bharara, S., King, P.H., Nabors, L.B., Cobbs, C.G., Britt, W.J., 2002. Human Cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res.* 62, 3347–3350.
- Cohen, J.L., 2000. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 343 (7), 481–492.
- Crum, C.P., 2002. The beginning of the end for cervical cancer? *N. Engl. J. Med.* 347, 1703–1705.
- Crumpacker, C.S., 2004. Use of antiviral drugs to prevent herpesvirus transmission. *N. Engl. J. Med.* 350, 11–20.
- Doniger, J., Muralidhar, S., Rosenthal, L.J., 1999. Human Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 367–382.
- Douglas, K.M., Gordon, C., Osman, H., Heaton, S., Skan, J., Situnayake, D., Bowman, S.J., 2003. Lupus and Zoster. *Lancet* 362, 616.
- Drexler, M., 2002. Secret Agents: the menace of emerging infections, 1st Edition. National Academy of Sciences, Washington DC.
- Duprez, R., Lacoste, V., Hermouet, S., Troussard, X., Valensi, F., Merle-Beral, H., Gessain, A., 2004. Plasma-cell leukemia and human herpesvirus 8 infection. *Leukemia* 18, 1903–1904.
- Ellerin, T.B., Walsh, Hooper, D.C., et al., 2004. Recurrent meningitis of unknown aetiology. *Lancet* 364, 501–502.
- Evans, R.J., Willie, F.S., Wynford-Thomas, D., Kipling, D., Jones, C.J., 2003. A P53-dependent, Telomere-independent proliferative life span barrier in human astrocytes consistent with the molecular genetics of glioma development. *Cancer Res.* 63, 4854–4861.
- Flore, O., 2004. Kaposi's Sarcoma. *Lancet* 364, 740–741.
- Glaser, S.L., Ambinder, R.F., DiGiuseppe, J.A., Horn-Ross, P.L., Hsu, J.L., 1998. Absence of Epstein-Barr virus transcripts in an epidemiological diverse group of breast cancers. *Int. J. Cancer* 75, 555–558.
- Grundhoff, A., Ganem, D., 2004. Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication Kaposi sarcoma pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 113, 124–136.
- Harkins, L., Volk, A.L., Samanta, M., Mikolaenko, I., Britt, W.J., Bland, K.I., Cobbs, C.S., 2002. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet* 360, 1557–1563.
- Hermouet, S., Sutton, C.A., Rose, T.M., Greenblatt, R.J., Corre, I., Garand, R., Neves, A.M., Bataille, R., Casey, J.W., 2003. Qualitative and quantitative analysis of human herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. *Leukemia* 17, 185–195.
- Hill, J.M., Cebhardt, B.M., Azcui, A.M., Mathews, K.E., Lukiw, W.J., Steiner, I., Thompson, H.W., Ball, M.J., 2005. Can a Herpes Simplex virus type 1 neuroinvasive score be correlated to other risk factors in Alzheimer's disease? *Med. Hypotheses* 64, 320–327.
- Hjalgrim, H., Askling, J., Rostgaard, K., 2003. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N. Engl. J. Med.* 349, 1324–1332.
- Huang, L., Chao, S., Hwang, J., 2004. Human papillomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma. *Cancer* 100, 327–334.
- IARC, 1997. Epstein-Barr virus and Kaposi sarcoma herpesvirus/herpesvirus 8. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, France. IARC. Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum., 70, pp. 1–492.
- Kinlen, L.J., Balkwill, A., 2001. Infective cause of childhood Leukemia and wartime population mixing in Orkney and Shetland, UK. *Lancet* 357, 858.
- Kleinschmidt-DeMasters, B.K., Gilden, D.H., 2001. The expanding spectrum of herpesvirus infection of the nervous system. *Brain Pathol.* 11 (4), 440–451.
- Krieger, N., Strong, E.F., Makosky, C., Weuve, J., 2003. Breast cancer, birth cohorts and Epstein-Barr virus: methodological issues in exploring the "Hygiene Hypothesis" in relation to breast cancer, Hodgkin disease and stomach cancer. *Cancer Res.* 63, 405–411.
- Kurzrock, R., Talpaz, M., 1999. Molecular biology in cancer medicine, 1st Edition. Martin Dunitz, London.
- Labrecque, L.G., Barnes, D.M., Fentiman, I.S., Griffin, B.E., 1995. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res.* 55, 39–45.
- Lan, K., Kuppers, D.A., Verma, S.C., Sharma, N., Murakami, M., Robertson, E.S., 2005. Induction of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen by the lytic transactivator RTA: a novel mechanism for establishment of latency. *J. Virol.* 79, 7453–7465.
- Lau, S.K., Chen, Y.Y., Chen, W.G., Diamond, D.J., Mamelak, A.N., Zaia, J.A., Weiss, L.M., 2005. Lack of association of Cytomegalovirus with human brain tumors. *Mod. Pathol.* 18, 838–843.
- Lin, J.C., Wang, W.Y., Chen, K.Y., Wei, Y.H., Liang, W.M., Jan, J.S., Jiang, R.S., 2004. Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 350, 2461–2470.
- McClain, K.L., Leach, C.T., Jensen, H.B., 1995. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. *N. Engl. J. Med.* 332, 12–18.
- Macswen, K.F., Crawford, D.H., 2003. Epstein-Barr virus—recent advances. *Lancet, Infect. Dis.* 3, 131–140.
- Martini, F., Iacheri, L., Lazzarin, L., Carinci, P., Corallini, A., Gerosa, M., Iuzzolino, P., Barbanti-Brodano, G., Tognon, M., 1996. SV40 early region and large antigen in human brain tumors, peripheral blood cells, and sperm fluids from healthy individuals. *Cancer Res.* 56, 4820–4825.
- Muñoz-Marmol, A.M., Mola, G., Ruiz-Larroya, T., Fernandez-Vasalo, A., Vela, E., Mate, J.L., Ariza, A., 2006. Rarity of JC virus DNA sequences and early proteins in human gliomas and medulloblastomas: the controversial role of JC virus in human neurooncogenesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32, 131–140.
- Osterholm, M., 2000. Emerging infections — Another warning. *N. Engl. J. Med.* 342, 1280–1281.
- Pagano, J.S., Blaser, M., Buendia, M.A., Damania, B., Khalili, K., Raab-Traub, N., Roizman, B., 2004. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin. Cancer Biol.* 14, 453–471.
- Prévot, S., Nérès, J., de Saint Maur, P.P., 1994. Detection of Epstein-Barr virus in an hepatic neoplasm in an adult human immunodeficiency virus 1-infected patient. *Virchows Arch.* 425, 321–325.
- Prober, C., 2005. Sixth disease and the ubiquity of human herpesvirus. *N. Engl. J. Med.* 352, 753–755.
- Quackenbush, S.L., Work, T.M., Balazs, G.H., Casey, R.N., Rovnak, J., Chaves, A., duToit, L., Baines, I.D., Parrish, C.R., Bowser, P.R., Casey, J.W., 1998. Three closely related herpesvirus are closely associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology* 246, 392–399.
- Ribalta, T., Martinez, A.J., Jares, P., Muntane, J., Miquel, R., Claramonte, X., Cardesa, A., 2002. Presence of occult Cytomegalovirus infection in the brain after orthotopic liver transplantation. An autopsy study of 83 cases. *Virchows Arch.* 440, 166–171.

- Rose, T.M., Strand, K.B., Schultz, E.R., Schaefer, G., Rankin, G.W., Thoulless, M.F., Tsai, C.C., Bosch, M.L., 1997. Identification of two homologs of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 in retroperitoneal fibromatosis of different macaque species. *J. Virol.* 71, 4138–4144.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrovski, S., McCallum, C.M., Henikoff, S., 1998. Consensus degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* 26, 1628–1635.
- Rossi, G., Bonetti, F., 2004. EBV and Burkitt's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 350, 1328–1337.
- Samanta, M., Harkins, L., Klemm, K., Britt, W.J., Cobbs, C.S., 2003. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J. Urol.* 170, 998–1002.
- Snanoudj, R., Durrbach, A., Leblond, V., Caillard, S., Hurault De Ligny, B., Noel, C., Rondeau, E., Moulin, B., Mamzer-Bruneel, M.F., Lacroix, C., Charpentier, B., 2003. Primary brain lymphomas after kidney transplantation: presentation and outcome. *Transplantation* 76, 930–937.
- Thorley-Lawson, D.A., Gross, A., 2004. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 350, 13228–13237.
- Timms, J.M., Bell, A., Flavell, J.R., Murray, P.G., Rickinson, A.B., Traverse-Glehen, A., Berger, F., Delecluse, H.J., 2003. Target cells of Epstein-Barr virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 361, 192–193.
- Tsellis, A., Jenson, H.B., 2006. Epstein-Barr virus, 1st Edition. Taylor and Francis, New York.
- Van Devanter, D.R., Warren, P., Bennet, L., Schultz, E.R., Coulter, S., Garber, R.L., Rose, T.M., 1996. Detection and analysis of diverse herpes viral species by consensus primer PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1666.
- Vieira, J., O'Hearn, P., Kimball, L., Chandran, B., Corey, L., 2001. Activation of Kaposi's sarcoma-associated virus (Human herpesvirus 8) lytic replication by Human Cytomegalovirus. *J. Virol.* 75, 1378–1386.
- Wang, C.Y., Sugden, B., 2004. New viruses shake old paradigms. *J. Clin. Invest.* 113, 21–23.
- Weller, T.H., 1983. Varicella and herpes zoster: changing concepts of the natural history, control and importance of a not so benign virus. *N. Engl. J. Med.* 309, 1362,1434.
- Whitley, R.J., Roizman, B., 2001. Herpes Simplex Virus Infections. *Lancet* 357, 1513–1518.
- Wrensch, M., Weinberg, A., Wiencke, J., Masters, H., Miike, R., Barger, G., Lee, M., 1997. Does prior infection with varicella-zoster virus influence risk of adult glioma? *Am. J. Epidemiol.* 145, 594–597.
- Wrensch, M., Weinberg, A., Wiencke, J., Miike, R., Barger, G., Kelsey, K., 2001. Prevalence of antibodies to four herpesvirus among adults with glioma and controls. *Am. J. Epidemiol.* 154, 161–165.
- Wright, D.K., Manos, M.M., 1990. Sample preparation from paraffin-embedded tissue. In: Innis, M.A., Gelfont, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Chapter 19. Academic Press, San Diego, pp. 153–158.
- Zhang, L., Zhang, J., Lambert, Q., Der, C.J., Del Valle, L., Miklosy, J., Khalili, K., Zhou, Y., Pagano, J.S., 2004. Interferon regulatory factor 7 is associated with Epstein-Barr virus-transformed central nervous system lymphoma and has oncogenic properties. *J. Virol.* 78, 12987–12995.
- zur Hausen, H., 2000. Papilloma viruses causing cancer evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 690–698.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Qualitative and quantitative analysis of human herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma

S Hermouet^{1,2,3}, CA Sutton¹, TM Rose⁴, RJ Greenblatt¹, I Corre⁴, R Garand³, AM Neves^{1,5}, R Bataille^{2,3} and JW Casey¹

¹Department of Microbiology and Immunology, Cornell University, Ithaca, NY, USA; ²INSERM U463, Institut de Biologie, Nantes, France; ³Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France; ⁴Department of Pathobiology, School of Public Health and Community Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA; and ⁵Department of Immunology and Genetics, College of Medical Sciences, New University, Lisbon, Portugal

Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to quantify viral loads of human herpesviruses (HHVs) at diagnosis in 61 samples of malignant B cells: 21 chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), 29 acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) and 11 multiple myeloma (MM); control samples were blasts from 16 acute myeloid leukemia (AML) and 24 blood or bone marrow samples from healthy donors. The majority of samples from healthy donors and patients (B-ALL, B-CLL or AML, but not MM) was positive for EBV and contained <100 EBV copies/100 ng DNA. EBV loads were occasionally high (>500 copies/100 ng DNA) in B-ALL (2/16) and in B-CLL (2/21) samples. The fractions of samples positive for HHV-8 and HHV-6A, less than 10% for MM patients, were high for adults with B-ALL (18.8% HHV-8+, 43.8% HHV-6A+) or B-CLL (28.6% HHV-8+, 52.4% HHV-6A+). B-ALL, B-CLL and MM samples were rarely positive for HHV-6B and HHV-7. Lastly, 75% of B-ALL samples were positive for CMV, and CMV loads were significantly higher in B-ALL samples than in MM, B-CLL or AML samples. We also used PCR with consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODEHOP) to look for novel HHVs in B cell samples: no sequence indicative of a new HHV was detected. Altogether, the data indicate that the presence of multiple HHVs, including EBV and CMV at high loads, is not rare in B-ALL and B-CLL cell samples. Future prospective studies should determine whether patients with high EBV/CMV loads at diagnosis in tumor samples face a higher risk of delayed hematological recovery, virus-related complications or relapse.

Leukemia (2003) 17, 185–195. doi:10.1038/sj.leu.2402748

Keywords: human herpesvirus; lymphocytic leukemia; multiple myeloma; real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR); PCR with consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODEHOP)

Introduction

The infectious origin of a number of human cancers is now well established. The best known associations among solid tumors are *Helicobacter pylori* with gastric adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALT), *Schistosoma* with bladder (*S. haematobium*) and colon (*S. mansoni*) cancers, hepatitis B and C viruses (HBV, HCV) with hepatocarcinoma, and papilloma virus with cervical cancer.¹ In hematology, four viruses are known to be co-factors of malignant diseases in humans. Human T cell leukemia virus-1 (HTLV-1) is responsible for a T cell leukemia endemic in Japan.^{1,2} Hepatitis C virus (HCV) is associated with mixed cryoglobulinemia, some lymphoplasmacytoid lymphoma, marginal zone lymphoma and diffuse large B cell lymphoma.^{3,4} The neoplastic potential of at least two human herpesviruses with B lymphocyte tropism, Epstein-Barr virus (EBV or HHV-4) and Kaposi's sarcoma herpes virus (KSHV or HHV-8) has

been established, especially within the context of treatment with immunosuppressive agents or co-infection with human immunodeficiency virus (HIV).^{1,5,6} EBV can induce Hodgkin and Burkitt's lymphoma and immunodeficiency-associated lymphoma observed in AIDS patients and graft recipients.^{1,5} HHV-8 is responsible for the induction of a particular type of lymphoma termed 'body-cavity' or primary-effusion lymphoma (PEL) and Castleman's disease.^{1,7,8} The role played by HHV-6, a virus with T lymphocyte tropism but reportedly found in tumor cells of several patients with B cell lymphoma, is still uncertain.^{9,10}

The potential involvement of HHVs in well-characterized hematological malignancies can be more precisely investigated using recently developed sensitive and quantitative methods, such as qPCR,^{11,12} to relate virus loads to disease emergence and progression. In addition, the increase in comparative sequence information of genes from various species has allowed the development of a number of nucleic acid-based approaches to search for additional HHV homologues. PCR using consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODEHOP)^{13,14} for example, has provided a means for the identification of a number of new herpesviruses that are refractive to cell culture propagation.^{15–17} The level of sophistication of new PCR approaches is sufficiently advanced to initiate a search for unidentified herpesviruses associated with malignant human cell proliferation. A new bovine herpesvirus, bovine lymphotropic herpes virus, BLHV, associated with persistent lymphocytosis,¹⁷ a new marine turtle α -herpesvirus associated with fibropapillomatosis in sea turtles¹⁶ and two HHV-8 homologs in retroperitoneal fibromatosis of different macaque species¹⁵ were recently identified using CODEHOP PCR techniques. The CODEHOP PCR approach is at least three orders of magnitude more sensitive than the method described by Donehower *et al.*¹⁸ The higher specificity and sensitivity is due primarily to the use of much longer primers containing a degenerate core and a consensus clamp, and the ability to run the reaction at either a higher temperature or with a temperature ramp.

We chose to begin this study with three categories of B cell malignancies of still unknown origin: child and adult B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and multiple myeloma (MM). Arguments for a viral etiology have been presented for these diseases.^{19,20} Our objectives were two-fold: first, to quantify virus loads of known HHVs capable of infecting lymphocytes (EBV, HHV-8, HHV-6 variants A and B, HHV-7) and also CMV using qPCR; second to search for the presence of new herpesviruses using CODEHOP PCR.

Correspondence: S Hermouet, Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, 9 Quai Moncousu, 44093 Nantes, France; Fax: +33 2 40 08 41 14
 Received 18 March 2002; accepted 29 July 2002

Materials and methods

Patient samples

With the patients' and donors' informed consent, a total of 101 BM or blood samples were tested for HHV loads. Blood and BM samples of 61 patients with B cell malignancies (29 B-ALL, 13 children and 16 adults; 21 B-CLL; 11 multiple myeloma) were collected at diagnosis prior to treatment. Forty control samples were also collected: 16 acute myeloid leukemia (AML) and 28 samples from 24 healthy donors: 17 samples of peripheral blood lymphocytes (PBL), four samples of B lymphocytes purified from blood, four samples of CD34⁺ cells purified from blood or BM, and three samples of non-purified BM. B lymphocytes and CD34⁺ cells were purified ($\geq 98\%$ pure) according to the manufacturer's instructions with CD19 and CD34 MicroBead isolation kits (Miltenyi Biotec, Paris, France). Non-purified samples were submitted to Ficoll centrifugation to separate mononuclear cells, then kept frozen in liquid nitrogen until use. For B-ALL, B-CLL and AML patients, most samples contained at least 90% of tumor cells (blasts for B-ALL and AML, B lymphocytes for CLL). For MM patients, only samples with at least 50% plasma cells were collected. The median percentages of tumor cells before Ficoll separation varied from 76.5% (AML) to 96% (B-ALL), ensuring that after Ficoll centrifugation, almost all the cell preparations studied contained more than 90% tumor cells. The geographic area from which patients and healthy donors originated was Western France (B-ALL, B-CLL, AML, MM, healthy donors) but a few samples were from Portugal (B-ALL, healthy donors) and north eastern USA (healthy donors).

Cytomorphology and immunophenotyping

The diagnosis of each specimen was based on a comprehensive analysis of the clinical, morphological and immunophenotypical features. Blood and bone marrow smears and cytospins were stained by May-Grünwald-Giemsa (MGG) and examined by direct microscopy. Immunophenotyping of tumoral cells was performed by multicolor flow cytometry analysis (FACS Calibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using appropriate panels of monoclonal antibodies as previously described.²¹⁻²³ AML and B-ALL immunophenotypic profiles were classified according to the EGIL proposals (for B-ALL: B-I/pro-B (CD10⁺), B-II/common B (CD10⁺), B-III/pre-B (c μ ⁺) and B-IV/mature B (surface immunoglobulin or slg⁺)).^{21,24} Diagnosis of B-CLL was established when the CLL score, including CD5, CD22, CD23, slg and FMC7 antigen expression, was ≥ 4 .²⁴

DNA preparation

Pellets of BM or blood mononuclear cells (aliquots of 3 to 5 millions cells, except for aliquots of purified B lymphocytes or CD34⁺ cells, which contained 1.5 to 2 millions cells) were thawed, washed in PBS and genomic DNA was prepared using QIAamp DNA mini-kits for blood and tissue samples (Qiagen, Valencia, CA, USA). DNA preparations were kept at 4°C until use for either qPCR or CODEHOP PCR.

Real-time quantitative PCR (qPCR)

qPCR was performed using the ABI 7700 Prism PCR instrument, with TaqMan reagents and fluorescent probes from ABI/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Primers and probes specific for an 80-85 bp amplicon within the DNA polymerase gene of EBV, CMV, HHV-6 variants A and B, HHV-7 and HHV-8 were designed and are described in Table 1.

Internal standards were made from each HHV's DNA polymerase amplicon, amplified from infected cell lines: AA2 for EBV, BCBL2 for HHV-8, HSB2/HHV-6 for HHV-6 (AIDS Repository), human fibroblasts for CMV, followed by cloning into TOPO-TA vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For HHV-7, internal standards were made by hybridizing two 54-mer oligonucleotides corresponding to HHV-7 DNA polymerase (Table 1), followed by PCR amplification with specific primers and cloning into the TOPO-TA vector. After verifying each clone by sequencing, DNA preparations of the TOPO-TA constructs containing EBV, CMV, HHV-6 A and B, HHV-7 and HHV-8 DNA polymerase amplicons were used as copy number standards for qPCR assays. The specificity, sensitivity and reproducibility of the qPCR assays were verified using DNA from cells known to be infected with the HHVs studied. The qPCR assays thus developed were mono-specific and highly sensitive (<10 copies of HHV DNA in 100 ng cellular DNA). They were fully reproducible for samples with copy numbers higher than 50. For samples with less than 50 copies/100 ng DNA, several independent qPCR amplifications were performed; samples were considered positive when at least two independent qPCR were positive. qPCR for each of the HHVs listed above were performed on 100 ng of DNA per reaction; this corresponds to approximately 15 000 cells assuming that each cell contains 6 pg of DNA. Amplification was performed in a reaction volume of 25 μ l for forty cycles (15 s at 95°C, 1 min at 60°C). Most samples were tested twice; samples with low copy numbers were tested at least twice. Results are expressed as mean numbers of copies of HHV DNA polymerase per 100 ng of cellular DNA.

HHV-8 v-cyclin nested PCR

A first round of PCR amplification was performed with outer primers 5'-TTCCTTCTGTGTTACTTAAATGCTGG-3' (forward primer, sequence position: 467-492 bp) and 5'-GAAACA-GATGTTAGGATCTGTTCCAC-3' (reverse primer, sequence position: 742-717 bp) on 100 ng of DNA per 50 μ l reaction. After 5 min at 94°C, the amplification program consisted of 30 s at 94°C, 20 s at 57°C and 20 s at 72°C for 35 cycles, followed by 5 min at 72°C. A second round of nested PCR was performed with inner primers 5'-CTCCCAA-CACCTGGACTTTTG-3' (forward primer, sequence position: 497-517 bp) and 5'-CGCCTGTAGAACGGAACATC-3' (reverse primer, sequence position: 713-693 bp) with 2.5 μ l of the first PCR product in a 50 μ l reaction, following the same amplification program as the first PCR. The size of the final PCR product was 215 bp. PCR products were run on a 2.5% agarose gel and stained with ethidium bromide for UV visualization. PCR products of the predicted size were then extracted from the gel (Qiaex II kit; Qiagen), cloned into the TOPO-TA vector and sequenced at the BioResource Center, Cornell University. Amplicon sequences were analyzed by comparison to sequences available in NCBI BLAST search.

Table 1 Oligonucleotide primers and probes for qPCR of HHV DNA polymerase

Primers and probes	Orientation	Sequence (5'→3')	Sequence position (bp)
EBV			
Forward primer	+	TCTGCTTTTCAACGGAGCTCA	2699–2719
Reverse primer	–	ACTTCTGGTAGACGCCAGGT	2779–2759
6FAM probe	+	GCTCTCAGCCTACAAGAGCACCCAGATG	2727–2754
HHV-8			
Forward primer	+	CGTTTACCACCGAGCTAAGCC	2692–2712
Reverse primer	–	GTAGCTTTTGGTACACGGTCAGG	2773–2751
6FAM probe	+	CGCTGGCGGACTACAAGACGCA	2719–2740
CMV			
Forward primer	+	CCTGGTGCTTTCGTCGGT	3167–3184
Reverse primer	–	CAATCGCTTAATGACGGCCAAT	3251–3230
6FAM probe	+	AAGGACATCTCGTGTACCGTCAATCTAACC	3192–3222
HHV-7			
Internal standard (fwd)	+	ATTCTGCCTACAAGCAAGCAAAATTTACCACATTTGGCTGTTGTTAAAGGTTA	2682–2735
Internal standard (rvse)	–	CTCCTATGTTTGGCAACTCTTCCTTTCTTGAGCTAACCTTTTAACAACAGCCAA	2769–2715
Forward primer	+	TCTGGCTAGAACGAAGAAATTT	2685–2707
Reverse primer	–	CTATGTTGGCAACTCTTCCTTTCT	2766–2742
6FAM probe	–	TGAGCTAACCTTTTAACAACAGCCAAATGTGG	2740–2709
HHV-6 (A and B)			
Internal standard (fwd)	+	AATGTTGCTCCTCTGTGCTTTCCAAGGA	2658–2684
Internal standard (rvse)	–	TTACCAATAGATGGTGCTATTAACACATAC	2810–2781
6FAM probe	–	TCTGCGCCAACCTTCTAATGACGCTAA	2743–2717
HHV-6A			
Forward primer	+	GTTGTCTCTGTGCTTTCCAAA	2657–2678
Reverse primer	–	GCCAATAGATGGTGCTATTAACACG	2808–2784
HHV-6B			
Forward primer	+	TGTTGTCTCTGTGCTTTCCAAG	2659–2681
Reverse primer	–	TTACCAATAGATGGTGCTATTAACACA	2810–2784

EBV, HHV, CMV: Internal standards were made by amplification from infected cells of a 80–85 bp sequence of the DNA polymerase using PCR with primers specific for each virus. HHV-7: The internal standard was made by hybridization of two 54 bp oligonucleotides followed by PCR amplification with HHV-7-specific primers. HHV-6: The internal standard was made by PCR amplification from infected cells of a 150 bp sequence of the DNA polymerase with primers not distinguishing between types A and B. All PCR products were sequenced, and the equivalent of DNA copy numbers determined, to be used as internal standards for qPCR. qPCR reactions were performed with primers and probes specific for each virus. For HHV-6, the primers were specific for each subtype, but the probe was common, 100% identical to a common sequence of subtypes A and B. Orientation: +, sense; –, anti-sense.

HHV-6A DNA polymerase PCR

PCR amplification was performed with HHV-6A primers 5'-GTTGTCTCTGTGCTTTCCAAA-3' (forward primer, sequence position: 2657–2678 bp) and 5'-GCCAATA-GATGGTGCTATTAACACG-3' (reverse primer, sequence position: 2808–2784 bp) on 100 ng of DNA per 50 µl reaction. After 5 min at 94°C, the amplification program consisted of 30 s at 94°C, 20 s at 57°C and 20 s at 72°C for 35 cycles, followed by 5 min at 72°C. The size of the final PCR product was 152 bp. PCR products were isolated, cloned and sequenced as described above.

CODEHOP PCR

To reveal any novel HHVs, DNA samples found negative for HHVs by qPCR were analyzed by CODEHOP PCR with primer pools designed to recognize all HHVs, as described.¹⁵ These primers were modeled on consensus amino acid sequences in the most conserved gene in herpesviruses, DNA polymerase, with a consensus 5' clamp and a degenerate 3' sequence.^{15–17} The primers were slightly modified to bring them closer to the sequences of the known HHVs (Table 2).

The HHV CODEHOP PCRs were performed on 100 ng of DNA and, occasionally, on both 100 ng and 1 µg of DNA. A semi-nested PCR reaction was performed, using first 100

pmoles of either DFAS (γ/α herpesviruses) or DFQS (β herpesviruses) and GDTD primers (55°C or 60°C, 35 cycles). Then, 2% of the PCR reaction was subjected to a second amplification using 100 pmoles of TCNAVYG and GDTD primers, under the same conditions. The primers were tested on DNA extracted from cells infected with a known number of the different HHVs (determined by qPCR). Under the conditions used, the lowest number of viral copies detected with the sets of primers DFAS/GDTD and TCNAVYG/GDTD was 10 for EBV and HHV-8, 100 for CMV and 1000 for HHV-6 (data not shown). Products of CODEHOP PCR directed at amplifying HHV polymerase amplicons were separated on 2.8% agarose gels (the expected sizes of PCR products are approximately 225 bp for HHVs). PCR amplicons of the expected size were purified then cloned into TOPO-TA vector for sequencing. Amplicon sequences were analyzed by comparison to sequences of known viruses available in data banks (NCBI BLAST search).

Statistical analysis

Mann-Whitney's rank sum test was used to compare data of different groups of patients, and Fisher's exact test to compare proportions. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

Table 2 HHV amino acid and nucleotide alignments (DNA polymerase gene)

DFAS/DFQS		VVVFDFASLYPS															
HSV-1/2	695	GYGGAGVLDPSTSGFHVNPVVVFDFASLYPSIOAHNLCFSTL															
EBV	562	GYGGATV/IQPLSGFYNSPVLVDFDFASLYPSIOAHNLCYSTM															
HHV-8	563	GYGGATV/SPSPGFYNDPVLVDFDFASLYPSIOAHNLCYSTL															
CMV	595	SYGGATVFEPEVGYNYNDPAVVFDFASLYPSIMAHNLCYSTL															
HHV-6A/B	550	GYKGATVLEPKTGYAAVPTVVFDFQSLYPSIMMAHNLCYSTL															
HHV-7	549	GYKGATVLEPKGIYAAVPTVVFDFQSLYPSIMMAHNLCYSTL															
		T/V	V/L	V	F/V	D	F	A/Q	G/C	C	T/G	Y	P				
HSV-1/2		G/G	G/G	G/G	T/T	GAC	T/T	G/GC	AGC	CTG	TAC	CCC					
EBV		G/T	C/T	G/T	G/T	GAC	T/T	G/C	AGC	CTG	TAC	CCG					
HHV-8		GTA	CTC	G/T	G/T	GAT	T/T	G/C	AGC	T/TG	TAC	CCC					
CMV		G/TG	G/C	G/T	T/T	GAT	T/T	G/C	AGC	C/T	TAC	CCT					
HHV-6A		ACC	G/T	G/T	T/T	GAT	T/T	CAA	AGT	T/TG	TAT	CCG					
HHV-6B		ACT	G/T	G/T	T/T	GAT	T/T	CAG	AGT	T/TG	TAT	CCG					
HHV-7		ACA	GTA	G/T	T/T	GAT	T/T	CAA	AGT	T/TG	TAT	CCA					
(forward)																	
'DFAS' primer	5'-ATG	G/T	G/T	T/T	GAC	T/T	G/C	AGY	Y/TN	TAY	CC-3'						
'DFQS' primer	5'-ATG	G/T	G/T	T/T	GAC	T/T	CAA	AGY	Y/TN	TAY	CC-3'						
Rose et al ¹⁵				5'-GTG	T/T	GAC	T/T	GCN	AGY	Y/TN	TAY	CC-3'					
TCNAVYGG		TCNAVYGGTGG															
HSV-1/2	797	PEEAVLLDKQQAIAIVVCNSYVGTGGVQHGLLPCLHVAATVT															
EBV	667	PQRRTLDKQQLAIKICTNSNAVYGGTGGVANHLPCLSAIETVT															
HHV-8	667	PALKTILDKQQLAIKICTNSNAVYGGTGGVSGIILPCNIAETVT															
CMV	797	PVRMLLDDKEQMALKVTCNFAVGTGGVWNGMMPCLPIAAIST															
HHV-6A/B	652	PMMRLDKKQLAKLTKTNSVYGTGAAGHMLPCVAIAASVT															
HHV-7	651	PVMEMLLDKKQLAKLTKTNSVYGTGGVATSHLLPCVAIAASVT															
		T/M/C	T/V	C	N	A/S	V/F	Y	G	V/F	T	G					
HSV-1		GTC	G/T	TGT	AAC	TCG	G/TG	TAC	G	TTC	ACG	GGA					
HSV-2		GTG	GTG	TGC	AAC	TCG	G/TG	TAC	GGG	TTC	ACG	GGG					
EBV		TGC	ACG	TGC	AAC	GCC	GTC	TAC	GGC	TTC	ACC	GGC					
HHV-8		GTT	ACC	TGC	AAC	GCC	GTT	TAC	GGC	TTC	ACG	GGG					
CMV		GTA	ACG	TGC	AAC	GCT	TTC	TAC	GGT	TTC	ACC	GGC					
HHV-6A/B		ACA	ACA	TGT	AAC	TCG	G/TG	TAC	GGT	GTC	ACG	GGA					
HHV-7		ACT	ACT	TGT	AAT	TCA	GTC	TAC	GGA	GTC	ACC	GGG					
(forward)																	
'TCNAVYGG' primer	5'-GTA	ACG	TGC	AAC	GCG	G/TG	TAC	GGN	KTN	ACN	GG-3'						
Rose et al ¹⁵		5'-ACG	TGC	AAC	GCG	G/TG	TAY	GGN	KTN	ACN	GG-3'						
GDTD		YGDGTDTS															
HSV-1/2	882	IYGDGTDTSIFVLC															
EBV	751	VIYGDGTDLSLFC															
HHV-8	749	VIYGDGTDLSLASI															
CMV	906	VIYGDGTDVSFVRF															
HHV-6A/B	736	VIYGDGTDLSFMSV															
HHV-7	735	VIYGDGTDLSLVTF															
		Y	G	D	T	D	S	V/I	F	T	V/M	S/A	L	F			
HSV-1		TAC	G/G	GAC	ACG	GAC	TCC	ATA	TTC	GTT	GTC	T/G	C/G				
HSV-2		TAC	G/G	GAC	ACG	GAC	TCC	ATT	TTC	GTT	TAG	T/G	C/G				
EBV		TAC	G/G	GAC	ACG	GAC	TCG	CTT	TTC	ATC	GAG	T/G	C/G				
HHV-8		TAC	G/G	GAC	ACT	GAC	TCT	CTT	TTC	ATA	TGC	T/G	ATG				
CMV		G/G	GAC	GAC	GAC	GAC	AGC	G/T	CTT	GTC	CTC	TTC	CGT				
HHV-6A/B		TAT	GGT	GAT	ACG	GAT	AGC	ATC	TTC	ATG	TCT	TCT	GTC				
HHV-7		TAT	GGT	GAT	ACT	GAC	AGT	CTT	TTC	GTT	ACT	TTC	AAA				
(reverse)																	
'GDTD' primer	5'-CG	GAA	CGA	CAT	AAA	CAT	GGA	GTC	NGT	RTC	NCC	RTA-3'					
Rose et al ¹⁵	5'-CG	GCA	TGC	GAC	AAA	CAT	GGT	GTC	NGT	RTC	NCC	RTA-3'					

CODEHOP PCR oligonucleotide primers for HHV DNA polymerases.
Y = C+T; N = A+C+G+T; K = T+G; R = A+G; H = A+C+T; D = A+G+T.

Results

The presence and viral loads of EBV, HHV-8, CMV, HHV-7 and HHV-6 were studied by qPCR for the DNA polymerase of each HHV in preparations of tumor cells of 61 patients; data are detailed in Table 3 and analyzed in Table 4. Generally, when HHV loads differed, they differed depending on age and type of disease, not origin (blood or bone marrow) nor percentage of tumor cells in sample.

Measurements of EBV and HHV-8 DNA loads

The presence and loads of EBV and HHV-8, γ -herpesviruses known to be able to transform B cells, in tumor samples were distinct. For cells prepared from blood, all but one sample of PBLs or purified B lymphocytes from adult healthy donors were positive for EBV vs 36.4% of MM samples and 52.4% of B-CLL samples, but the differences were not statistically significant (Fisher's exact test). Bone marrow (BM) samples of

Table 3 Viral DNA loads in blood and BM samples from healthy donors and patients diagnosed with B-CLL, MM or B-ALL

Patients Controls	Age/Sex	Origin	Tumor cells, %	No. of copies/100 ng DNA					
				EBV	HHV-8	CMV	HHV-7	HHV-6A	HHV-6B
Healthy donors, children (n = 7)									
PBL C1	11 mo / F	blood	0	0	0	0	nd	0	0
PBL C2	6 / M	blood	0	0	0	0	nd	0	2
PBL C3	5 / F	blood	0	0	0	0	nd	0	0
PBL C4	2 / M	blood	0	0	0	0	0	0	2
PBL C5	7 / F	blood	0	0	0	0	0	0	3
PBL C6	3 / F	blood	0	81	0	0	0	0	0
PBL C7	2 / F	blood	0	0	0	0	0	0	2
Healthy donors, adults (n = 17)									
PBL A1	56 / M	blood	0	52	0	0	15	0	15
PBL A2	25 / M	blood	0	41	0	0	0	0	0
PBL A3	41 / F	blood	0	25	0	0	2	0	0
PBL A4	55 / F	blood	0	30	6	1	0	0	0
B-Ly A5	50 / F	blood	0	18	0	0	0	0	0
B-Ly A6	53 / M	blood	0	71	0	0	0	0	0
B-Ly A7	31 / M	blood	0	13	0	0	0	0	0
B-Ly A8	35 / M	blood	0	0	0	0	0	0	0
B-Ly A10	30 / F	blood	0	7	0	0	0	0	0
BM A11	nd	BM	0	0	0	0	2	0	0
BM A12	nd	BM	0	0	0	0	0	0	0
BM A13	nd	BM	0	0	0	0	0	0	0
CD34 A14	40 / M	BM	0	0	0	0	0	0	0
CD34 A15	38 / F	BM	0	0	0	0	0	0	0
CD34 A16	62 / F	blood	0	0	0	0	0	0	0
CD34 A17	42 / F	blood	0	0	0	0	0	0	0
AML, adults (n = 16)									
2946	67 / F	BM	M1, 80%	2	41	0	0	4	0
3229	45 / F	BM	M1, 90%	1	0	8	3	1	0
3035	72 / M	BM	M1, 95%	3	0	7	3	0	0
2907	69 / F	BM	M1, 77%	0	0	7	0	0	0
3021	53 / F	BM	M1, 89%	15	0	5	88	2	2
3004	56 / F	BM	M1, 59%	12	0	7	0	2	0
2928	15 / M	BM	M1EB, 59%	0	0	4	0	0	0
890	68 / F	blood	M2, 88%	0	0	0	0	0	0
3025	63 / F	BM	M2, 66%	0	33	1	0	0	0
3230	18 / F	BM	M2, 69%	6	68	7	0	0	0
3352	19 / M	BM	M2V, 50%	4	0	49	9	9	0
2908	73 / M	BM	M3, 95%	7	51	21	0	1	0
2971	46 / M	BM	M4, 76%	2	0	2	0	0	0
3665	53 / M	BM	M4, 52%	5	0	11	0	0	0
760	54 / M	BM	M5B, 82%	2	0	0	0	0	0
3638	74 / F	BM	M5B, 75%	2	0	12	0	0	0
B cell pathologies									
B-CLL (n = 21)									
1191	34 / M	BM	75% B CD5 ⁺	0	0	8	0	0	0
3364	77 / M	blood	92% B CD5 ⁺	0	0	0	0	0	0
3375	69 / F	blood	79% B CD5 ⁺	4	0	0	0	1	0
3386	54 / F	blood	80% B CD5 ⁺	88	3	3	0	3	0
3406	55 / M	blood	84% B CD5 ⁺	27	6	2	0	2	0
3427	75 / M	blood	88% B CD5 ⁺	27	11	0	0	3	0
3369	78 / M	blood	93% B CD5 ⁺	25	0	18	0	0	0
3393	53 / M	blood	89% B CD5 ⁺	135	1	10	0	5	14
3403	66 / F	blood	84% B CD5 ⁺	16	0	2	0	12	0
886	34 / F	blood	85% B CD5 ⁺	15	0	0	0	0	0
3216	66 / F	blood	91% B CD5 ⁺	0	0	0	0	0	0
3366	66 / F	blood	85% B CD5 ⁺	700	4	287	0	318	2
3435	62 / F	blood	97% B CD5 ⁺	12	0	0	0	26	0
3415	74 / F	blood	96% B CD5 ⁺	0	0	0	0	1	0
3672	29 / F	blood	73% B CD5 ⁺	0	0	0	0	0	0
3358	79 / M	blood	92% B CD5 ⁺	0	0	0	0	0	0
3697	57 / M	blood	99% B CD5 ⁺	0	0	0	0	0	0
3414	63 / M	blood	92% B CD5 ⁺	0	0	2	0	0	0
3385	68 / M	blood	84% B CD5 ⁺	0	0	0	0	1	0
3374	79 / M	blood	53% B CD5 ⁺	1010	4	4850	0	31	16
3357	81 / M	blood	86% B CD5 ⁺	0	0	7	0	0	0

(continued)

Leukemia

Table 3 (continued) Viral DNA loads in blood and BM samples from healthy donors and patients diagnosed with B-CLL, MM or B-ALL

Patients Controls	Age/Sex	Origin	Tumor cells, %	No. of copies/100 ng DNA					
				EBV	HHV-8	CMV	HHV-7	HHV-6A	HHV-6B
MM (n = 11)									
MM1	32 / M	blood	PCL, 98%	6	6.3 × 10 ⁶	0	35	0	0
MM2	67 / M	blood	MM, 71%	4	0	0	0	0	0
MM3	50 / F	blood	PCL, 90%	2	0	0	0	0	0
MM4	48 / M	blood	MM, 95%	0	0	0	0	0	1
MM5	50 / M	blood	MM, 80%	460	0	0	0	0	0
MM6	35 / M	blood	MM, 90%	0	0	0	0	0	0
MM7	49 / F	BM	PCL, 50%	0	0	0	0	0	0
MM8	60 / F	BM	MM	0	0	0	0	0	0
MM9	70 / F	BM	MM, 50%	0	0	0	0	0	0
MM10	61	solid	MM, 60%	0	0	0	0	0	0
MM11		tumor solid tumor	MM, 95%	0	0	0	0	4	0
B-ALL (n = 29)									
Children (n = 13)									
2732	4 / F	blood	LB-II, 99%	21	0	25	0	0	0
1595	10 / M	blood	LB-III My ⁺ CD5 ⁺ , 95%	0	0	0	0	0	0
3939	2 / M	BM	LB-II, 97%	0	0	0	0	0	0
2588	6 / F	BM	LB-II, 99%	24	0	45	0	35	0
3077	10 / F	BM	LB-II My ⁺ , 96%	0	0	7	0	0	0
3032	17 / M	BM	LB-II CD15 ⁺ , 90%	42	0	20	0	0	0
2597	16 / F	BM	LB-II My ⁺ , 95%	0	0	2	0	0	0
3524	10 / F	BM	LB-II, 99%	0	0	0	7	0	0
2770	1 / F	BM	LB-II My ⁺ , 99%	76	0	66	0	0	0
2599	5 / M	BM	LB-II My ⁺ , 90%	30	0	38	0	0	0
2733	13 / M	BM	LB-II, 95%	12	0	21	0	2	0
2589	4 / M	BM	LB-II, 99%	35	0	16	0	0	0
2572	2 / M	BM	LB-II, 90%	24	0	8	0	46	0
Adults (n = 16)									
2566	82 / F	blood	LB-II, 80%	0	0	17	0	0	0
2874	29 / F	blood	LB-II, 10%	2200	8	250	0	50	35
1712	37 / F	blood	LB-III My ⁺ , 78%	3	0	0	0	0	0
2744	51 / M	blood	LB-I CD15 ⁺ My ⁺ 95%	100	0	250	0	0	0
2012	19 / F	blood	LB-I CD15 ⁺ My ⁺ 99%	17	0	76	0	3	0
2667	26 / M	blood	LB-II, 80%	100	0	370	0	0	0
2737	33 / M	blood	LB-II My ⁺ , 75%	120	0	1300	0	6	0
2564	24 / M	blood	LB-II, 90%	4	0	0	0	0	0
2900	72 / M	BM	LB-III, 90%	0	0	74	0	0	0
2715	74 / F	BM	LB-II, 90%	0	0	0	0	0	0
2765	33 / M	BM	LB-I My ⁺ , 99%	20	0	35	0	4	0
3095	31 / M	BM	LB-III My ⁺ , 96%	92	0	46	0	0	0
2982	68 / F	BM	LB-II, 58%	710	16	170	0	6	0
3119	32 / M	BM	LB-II CD5 ⁺ , 90%	40	0	38	0	16	0
3575	24 / M	BM	LB-II, 98%	0	0	0	0	0	0
2663	68 / F	BM	LB-II My ⁺ , 99%	420	4	1300	0	2	0

healthy donors were all negative for EBV; in contrast, the majority of BM samples of B-ALL or AML patients were positive for EBV. EBV viral load was <100 copies/100 ng DNA in all samples of healthy donors and children with B-ALL, and in the majority of samples of adult patients with AML, MM, B-CLL or B-ALL. Overall, EBV loads for samples of B-ALL and B-CLL patients were not significantly different from EBV loads of control samples (PBL from healthy donors or AML samples) (Table 4). However, two out of 21 (9.5%) samples of B-CLL patients and two out of 16 (12.5%) samples of adult B-ALL patients had loads of EBV >500 copies/100 ng DNA (up to 2200 copies/100 ng DNA).

Most studies have concluded that rates of HHV-8 infection vary worldwide, less than 4% of the general population in

western Europe being positive for HHV-8.^{25,26} In our series, all samples of children and 10 out of 11 samples from MM patients were negative for HHV-8. The high frequency of HHV-8 positivity (18.8% to 28.6%) of B-ALL, AML and B-CLL patients was unexpected. HHV-8 DNA loads in B-CLL and B-ALL samples were all ≤16 copies/100 ng DNA (Table 4). When positive for HHV-8, AML samples had significantly higher loads. Among the MM samples, one sample from a patient diagnosed with plasma cell leukemia (PCL) had a very high load of HHV-8 (6.3 × 10⁶ copies/100 ng DNA); this particular case, unusual by its clinical and biological presentation and the observation that his blasts were co-infected with another virus, is the object of a separate, detailed study.²⁷ HHV-8 positivity was confirmed by nested PCR amplification

Table 4 Analysis of viral DNA loads in tumor cell preparations of patients with B-CLL, MM or B-ALL

	Age (yrs)	Sex (M/F)	Blood/BM	Tumor cells (%)	HHV DNA polymerase copies/100 ng DNA					
					EBV	HHV-8	CMV	HHV-7	HHV-6A	HHV-6B
Controls										
<i>Healthy Children, n = 7</i>										
median	3.0	2 M/5 F	7/0	0	0	0	0	0	0	2
range	0.9–7			0	0–81	0	0	0	0	0–3
% positive					14.3%	0%	0%	0%	0%	57.1%
median (positives only)					—	—	—	—	—	21
<i>Healthy Adults, n = 17</i>										
median	41	6 M/8 F	12 / 5	0	27 ^a	0	0	0	0	0
range	25–62	no data, 3		0	0–52	0–6	0–1	0–15	0	0–15
% positive					88.9%	5.9%	5.9%	17.6%	0%	5.9%
median (positives only)					27	—	—	2	—	—
<i>AML, n = 16</i>										
median	55	7 M/9 F	1 / 15	76.5	2	0	7	0	0	0
range	15–74			50–95	0–15	0–68	0–49	0–88	0–9	0–2
% positive					75%	25%	81.2% ^b	25%	37.5% ^b	6.2% ^b
median (positives only)					3	46	7	6	2	—
B cell pathologies										
<i>B-CLL, n = 21</i>										
median	66	12 M/9 F	20 / 1	86	4	0	0	0	1	0
range	29–81			53–99	0–1010	0–11	0–4850	0	0–318	0–16
% positive					52.4%	28.6%	47.6% ^b	0%	52.4% ^b	14.3%
median (positives only)					27	4 ^c	7	—	3	14
<i>MM, n = 11</i>										
median	50	5 M/4 F	6/3/2 ST	80	0	0	0	0	0	0
range	32–70	no data, 2		50–98	0–460	0–6.3 × 10 ⁶	0	0–35	0–4	0–1
% positive					36.4%	9.1%	0%	9.1%	9.1%	9.1%
median (positives only)					5	—	—	—	—	—
<i>B-ALL, 18 yr, n = 13</i>										
median	6.0	7 M/6 F	2/11	96	21	0	16	0	0	0
range	1–17			90–99	0–76	0	0–66	0–7	0–46	0
% positive					61.5%	0%	76.9% ^a	7.7%	23.1%	0%
median (positives only)					27	—	20	—	35	—
<i>B-ALL, 18 yr, n = 16</i>										
median	33	9 M/7 F	8/8	90	30	0	60	0	0	0
range	19–82			10–99	0–2200	0–16	170–1300	0	0–50	0–35
% positive					75%	18.8%	75% ^b	0%	43.8% ^a	6.2%
median (positives only)					96	8 ^c	123 ^c	—	6	—

Viral DNA load of known HHV's in tumor cell preparations of patients with B-CLL or MM, compared to controls (PBL from healthy adult donors, and tumor cell preparations from patients with AML).

^aPBL samples only.

^b*P* < 0.05, compared to healthy adult donors, Fisher's exact test.

^c*P* < 0.05, compared to AML, Mann-Whitney's test.

ST, solid tumors.

of HHV-8's *v*-cyclin gene. Of the 13 samples found positive for HHV-8 DNA by qPCR (6 B-CLL, 3 B-ALL, 4 AML), 12 were positive for HHV-8's *v*-cyclin by nested PCR (Table 5). For the 13th sample (3230), a sequence variation in the patient's HHV-8 *v*-cyclin gene may have prevented the primers from working. Sequencing of the PCR products confirmed the sequence of HHV-8 *v*-cyclin. In addition, for two patients positive for HHV-8, a second DNA preparation was made several months after the first, also from frozen aliquots of tumor cells, and the DNA subjected to both qPCR for HHV-8 DNA polymerase and nested PCR for HHV-8 *v*-cyclin. Both were positive (data not shown) and cloning and sequencing of the *v*-cyclin PCR products confirmed the presence of HHV-8 *v*-cyclin.

Measurements of HHV-7 and HHV-6 DNA loads

As a proof of principle, the presence and viral loads of the two T cell tropic HHVs, HHV-6 and HHV-7^{28,29} were also studied (Tables 3 and 4). Two variants of HHV-6, types A and B, have been described.²⁹ In the general population, in Europe and in the USA, HHV-6B is twice as prevalent (70%) as HHV-6A (30%), whereas in Africa HHV-6A appears to be predominant. In addition to its T cell tropism, HHV-6 seems to be capable of infecting B cells, as well as hematopoietic progenitors.³⁰

Six samples from 17 healthy donors were positive for HHV-7, but HHV-7 was rarely found in tumor samples of patients with B cell malignancies. For patients as well as for healthy

Table 5 PCR amplification of HHV-8 v-cyclin

Patient No.	HHV-8 copies / 100 ng DNA (TaqMan PCR)	Nested HHV-8 v-cyclin PCR	
		No. 1	No. 2
B-CLL			
3427	11	negative	positive
3393	1	negative	positive
3386	3	positive	
3406	6	positive	
3366	4	positive	
3374	4	positive	
B-ALL			
2982	16	positive	
2874	8	positive	
2663	4	positive	
AML			
3025	33	positive	
2946	41	positive	
3230	68	negative	
2908	51	positive	

100 ng of DNA from tumor cell samples found positive for HHV-8 DNA polymerase by qPCR were submitted to nested PCR for HHV-8 v-cyclin (see Methods). PCR products (215 bp) were separated by electrophoresis in a 2.5% agarose gel and stained by ethidium bromide. Two samples, negative with the first nested PCR assay were positive with a second assay; due to insufficient DNA, a second nested PCR assay could not be repeated for AML sample No. 3230. PCR products were cloned into TOPO-TA vector and sequencing confirmed HHV-8 cyclin.

donors, HHV-7 was logically found in samples known to contain T cells, such as preparations of purified T cells (3/5, not shown), PBL (2/4) and BM mononuclear cells (1/3) (Table 3). All preparations of purified B lymphocytes and CD34⁺ cells were negative for HHV-7. Accordingly, only one MM and one B-ALL sample were positive for HHV-7, but HHV-7 was found in four out of 16 AML samples, all containing less than 100 copies/100 ng DNA. Similarly, few samples were positive for HHV-6 type B. HHV-6B was found mainly in PBL of control children (4/7); all B-ALL samples from children were negative. For adults, HHV-6B was detected in samples of only one healthy donor, three B-CLL patients, one MM patient and one B-ALL patient. The highest HHV-6B load was 35 copies/100 ng DNA.

The infection rates for HHV-6 type A were very different. All samples from healthy donors, children and adults, were negative for HHV-6A, as were all but one MM sample. In contrast, a significant proportion of samples of patients with either B-ALL (43.8%, $P = 0.014$), B-CLL (52.4%, $P = 0.009$) or AML (37.5%, $P = 0.027$) was positive for HHV-6A. Except for one B-CLL sample, HHV-6A DNA loads were ≤ 50 copies/100 ng DNA. The presence of HHV-6A was verified by standard PCR amplification of the DNA polymerase. To confirm HHV6-A positivity, four samples (3 B-CLL, 1 B-ALL) positive for HHV-6A by qPCR were submitted to standard PCR (Figure 1); all four PCR products were positive and sequencing of the PCR products revealed sequences identical to the HHV-6A DNA polymerase sequence in the database. The patients' HHV-6A sequences differed by two bases from the sequence found in the HSB2/HHV-6 cells used in the laboratory. In addition, for two other patients, the presence of HHV-6A was confirmed on second, separate DNA preparations from different aliquots of tumor cells, by both qPCR and standard PCR amplification of HHV-6A DNA polymerase followed by sequencing (data not

HHV-6A DNA polymerase

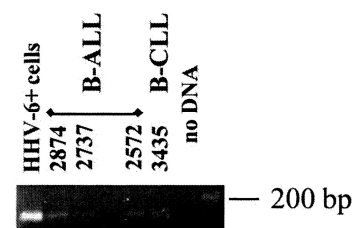


Figure 1 PCR amplification of HHV-6A DNA polymerase. 100 ng of DNA from tumor cell samples found positive for HHV-6A DNA polymerase by qPCR were submitted to standard PCR for HHV-6A DNA polymerase (see Methods). PCR products (152 bp) were separated by electrophoresis in a 2.5% agarose gel and stained by ethidium bromide.

shown). Five patient samples were positive for both types A and B of HHV-6: three B-CLL, one adult B-ALL, one AML.

Measurements of CMV DNA loads

CMV loads were significantly different in patients and in healthy donors, and they also differed according to pathology (Tables 3 and 4). Samples from healthy children were all negative for CMV and only one sample from a healthy adult was positive; all MM samples were also negative for CMV. In contrast, 47.6% of B-CLL samples ($P = 0.038$, compared to healthy adults) and 75% of B-ALL samples were positive for CMV ($P = 0.007$ compared to healthy adults). The rate of CMV positivity for AML samples was also high, 81.2% ($P = 0.007$). CMV loads were <100 copies/100 ng DNA for all B-ALL samples from children and all AML samples, as well as all but two B-CLL samples (one with 4850 copies/100 ng DNA). In contrast, six out of 16 of adults with B-ALL had blast samples containing more than 100 CMV copies/100 ng DNA, two out of 16 contained more than 500 CMV copies/100 ng DNA (up to 1300 copies/100 ng DNA) (Table 3). High (>500 copies/100 ng DNA) loads of CMV or/and EBV were observed in tumor cell samples of six adult patients with B-CLL (2/21, 9.5%) or B-ALL (4/16, 25%). CMV loads of samples from adult B-ALL patients were significantly higher than CMV loads of B-CLL ($P = 0.013$) or AML ($P < 0.001$) samples (Table 4). Additional aliquots of tumor cells were available for two patients with a positive CMV qPCR. For these two patients, the presence of CMV DNA was confirmed by qPCR on new DNA preparations from the second cell aliquots.

Measurements of viral DNA loads of other non-lymphocytic tropic HHVs (HHV-1, HHV-2, VZV)

All samples were also tested by qPCR for the three other, non-lymphocytic HHVs: herpes simplex virus-1 (HHV-1), herpes simplex virus-2 (HHV-2) and varicella-zoster virus (VZV). Two B-CLL samples were positive for HHV-1 (loads: 3 and 7

copies/100 ng DNA); two samples (1 AML, 1 B-CLL) were positive for HHV-2 (respective loads: 1 and 2 copies/100 ng DNA) and five samples (1 healthy donor, 1 MM and 3 B-ALL: 1 adult and 2 children, one with clinical symptoms of varicella) were positive for VZV (respective numbers of VZV copies/100 ng DNA: 2, 2, 6, 6 and for the patient with clinical symptoms, 370).

CODEHOP PCR for HHVs

Twenty samples (9 B-CLL, 7 MM, 4 B-ALL) were selected for CODEHOP PCR because of their negative or low viral loads of known HHVs as determined by qPCR. Most of the selected MM samples contained no HHVs, two contained HHV-6A (load: 1 and 4 copies/100 ng DNA); all the B-ALL samples were positive for CMV (loads: 2, 7, 17 and 74 copies/100 ng DNA), as were two B-CLL samples (loads: 2 and 7 copies/100 ng DNA); two other B-CLL samples were positive for EBV (loads: 4 and 15 copies/100 ng DNA), three were positive for HHV-6A (each 1 copy/100 ng DNA). As described in Methods, preliminary experiments determined that the lowest number of copies detectable by CODEHOP PCR, when performed in triplicate, was 10 for EBV, 100 for CMV and 1000 for HHV-6. Hence, we could predict that CODEHOP PCR would detect EBV in at least one sample, and possibly CMV in another sample. Two series of CODEHOP PCRs were performed, one with the DFAS primers designed to detect α - and γ -HHVs, the other with the DFQS primers designed to detect β -HHVs (Table 2). CODEHOP PCRs were negative for 16 of the 20 samples tested (6 B-CLL, 6 MM, all 4 B-ALL). One or both CODEHOP PCRs were positive for the other four samples (3 B-CLL, 1 MM). Sequencing of the PCR products revealed EBV sequences; two of the B-CLL samples were known to be positive for EBV by qPCR. No sequence compatible with a novel HHV was found.

Discussion

This study allows several conclusions: first, our data confirm other reports^{11,22} that, except for a particular patient with an unusual presentation of primary plasma cell leukemia (PCL),²⁷ HHV-8 is absent from MM plasma cells. They also show the absence of HHV-7 and HHV-6 type B in B-CLL, MM and B-ALL; because of their T cell tropism, it should be of interest to measure loads of these two viruses in T cell pathologies.

The second finding is that, at diagnosis, infection by HHV-6A and HHV-8 (adults only, all HIV-negative) appears more frequent in B-ALL, B-CLL or AML patients than reported in the general population of western Europe and the USA.^{25,26} The increased rate of positivity could be due to a higher sensitivity of our PCR techniques; this would imply that rates of HHV-8 and HHV-6A infection in the general population are currently underestimated. Another explanation, more appealing given the low rates of positivity in our control and MM series, is that patients with B-CLL, B-ALL or AML actually have a higher rate of HHV-8 and HHV-6A infection prior to the diagnosis of leukemia, and/or that during the leukemic process the two viruses become re-activated – thus, more easily detected by PCR techniques. However, all measurements reported here were made on cell-associated HHVs and status of latency vs productive infection were not addressed.

A third finding is that cell-associated viral DNA loads for EBV and particularly CMV vary depending on pathology. Con-

trol samples from healthy donors and AML patients had low EBV loads and very low loads of CMV, a virus which can infect several cell types, particularly granulocytes, monocytes, and hematopoietic progenitors. B-CLL and MM samples were also characterized by low loads of both EBV and CMV; MM samples tested negative for CMV. In contrast, B-ALL samples of adults had high cell-associated CMV loads; 25% had high loads of EBV or/and CMV. Of particular interest is the high rate of CMV positivity (>75%) of B-ALL samples from children. The rates of CMV seropositivity in the general population in western Europe is approximately 50% for adults and less than 30% for children under 12. It can be argued that re-activation of CMV during the leukemic process may render CMV more easily detectable. Because CMV may exert an anti-tumoral action and has the potential to transactivate replication of other viruses,^{33,34} further investigation of the role played by CMV in B-ALL is warranted.

HHVs may disrupt immune functions or/and induce mutations in infected cells. HHVs, alone or associated with other viruses, can transform cells even as a consequence of a transient infection, in a 'hit-and-run' manner, during an abortive viral cycle when expression of specific viral genes induces mutations in the host genome.^{35,36} Independent of their potential role in cell transformation, re-activation of presumably latent HHVs during the course of anti-leukemia treatment can occur, usually explained by suppression of immune functions in aggressively treated patients. HHV-8 is now recognized as a cause of fever, hepatitis and, with HHV-6 and CMV, of delayed hematopoietic recovery or bone marrow failure in immunosuppressed patients.^{37–40} Thus, an increased rate of positivity for HHV-6A, HHV-8 and CMV in leukemic patients raises several questions. Are these viruses found more frequently in leukemic patients because of a specific immune dysfunction toward HHVs? The negativity for all three HHVs of MM patients, who are also severely immunocompromised, argues against the possibility that a globally impaired immunity in B-ALL, AML and B-CLL patients solely explains their increased rate of HHV positivity. The processes of B-ALL or B-CLL induction may render affected individuals more susceptible to infection by HHVs, or to their reactivation from latency; in addition, dual herpesvirus infection can result in a synergistic effect on viral expression.¹⁴ In the near future, it is possible that the discovery at diagnosis of a high load of a HHV associated with a specific blood disorder will alert clinicians to significantly alter the treatment of this particular disease. In particular, quantitative studies during the course of the disease should establish whether B-ALL patients with high loads of EBV and CMV at diagnosis face an elevated risk of complications during treatment.^{37–43} Equally intriguing is the possibility of detecting particular patterns of virus expression and levels of cell-associated viral loads before any clinical sign of disease appears, as has been described for HHV-8 and Kaposi's sarcoma,⁴⁴ which obviously could further improve treatment efficacy. A recent study reported that B-CLL patients are five times more likely to develop Kaposi's sarcoma than healthy controls.⁴⁵

Finally, if one assumes that to be directly responsible for transformation, at least one copy of HHV per cell (ie a viral load $\geq 10^4$ copies/100 ng DNA) is necessary, only two patients (1 B-CLL, 1 B-ALL, with respectively, 10^3 and 2.2×10^3 copies of EBV/100 ng DNA) approached this level. Therefore, our study confirms the conclusion of a previous study limited to childhood ALL⁴⁶ that, taken separately, none of the HHVs found in B-ALL and B-CLL is present at levels high enough to be held responsible for B cell transformation. This was the

rationale for trying to identify a novel B cell tropic herpesvirus directly responsible for B cell transformation. In agreement with MacKenzie *et al*,⁴⁶ our CODEHOP PCR results argue strongly against this hypothesis. It could be that a novel HHV may have a different DNA polymerase sequence rendering it undetectable by CODEHOP primers, but this seems unlikely given that CODEHOP primers are capable of amplifying herpesvirus DNA polymerases from reptiles to humans.^{1,2-17} This study does not exclude, however, that a novel HHV may have been present in the samples tested, if the numbers of viral copies present were very low – below the detection limits of our PCR techniques.

In conclusion, this study shows that it is appropriate to hypothesize that for some patients HHVs may influence B-CLL and B-ALL clinical course. Further prospective studies should be valuable in determining whether high loads of HHVs found at diagnosis in leukemic cell samples are predictive of a poor prognosis and/or of the length of aplasia following chemotherapy, the quality and/or length of remission.

Acknowledgements

We are grateful to Mrs Danielle Pineau and Mr Yves Garreau for storing and sorting patient samples, to Mr Thomas A Paul and Mrs Rufina N Casey for technical help and advice, and to our colleagues from the Department of Hematology of the Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, France and the Pediatric Department of the District Hospital of Faro, Portugal, for providing blood and BM samples. SH was supported by a grant from NATO. RJG was supported by NIH training grant No. TZES07052E.

References

- 1 Parsonnet J (ed.). *Microbes and malignancy. Infection as a cause of human cancers*. Oxford University Press: New York, 1999.
- 2 Ferreira OC Jr, Planellas V, Rosenblatt JD. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. *Blood Rev* 1997; **1**: 91–104.
- 3 Dammacco F, Sansonno D, Piccoli C, Racanelli V, D'Amore FP, Lauletta G. The lymphoid system in hepatitis C virus infection: auto-immunity, mixed cryoglobulinemia, and overt B-cell malignancy. *Semin Liver Dis* 2000; **20**: 143–157.
- 4 Silvestri F, Barillari G, Fanin R, Salmaso F, Pipan C, Falasca E, Puglisi F, Mariuzzi L, Zaja F, Infanti L, Patriarca F, Candoni A, Rogato A, Di Loreto C, Botta GA, Baccarani M. Impact of hepatitis C virus infection on clinical features, quality of life and survival of patients with lymphoplasmacytoid lymphoma/immunocytoma. *Ann Oncol* 1998; **9**: 499–504.
- 5 Oudejans JJ, Jiwa NM, Meijer CJ. Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease: more than just an innocent bystander. *J Pathol* 1997; **4**: 353–356.
- 6 Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; **266**: 1865–1869.
- 7 Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 1995; **332**: 1186–1191.
- 8 Soulier J, Grollet L, Oksendler E, Cacoub P, Cazals-Atem D, Babinet P, d'Agay MF, Clauvel JP, Raphael M, Degos L, Sigaux F. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castelman's disease. *Blood* 1995; **86**: 1276–1280.
- 9 Torelli G, Marasca R, Luppi M, Sella F, Ferrari S, Narni F, Mariani MT, Federico M, Ceccherini-Nelli L, Bendinelli M, Montagnani G, Montorsi M, Artusi T. Human herpesvirus-6 in human lymphomas: identification of specific sequences in Hodgkin's

- lymphomas by polymerase chain reaction. *Blood* 1991; **77**: 2251–2258.
- 10 Ohnishi K, Yamamoto K. Quantification of human herpesvirus-6 in healthy volunteers and patients with lymphoproliferative disorders by PCR-ELISA. *Leukemia Res* 1999; **23**: 625–630.
- 11 Quackenbush SL, Casey RN, Murcek RJ, Paul TA, Work TM, Limpus CJ, Chaves A, duToit L, Vasconcelos Perz J, Aguirre AA, Spraker TR, Horrocks JA, Vermeer LA, Balazs GH, Casey JW. Quantitative analysis of Herpesviruses sequences from normal tissues and fibropapillomas of marine turtles with real-time PCR. *Virology* 2001; **287**: 105–111.
- 12 Lallemand F, Désiré N, Rozenbaum W, Nicolas J-C, Maréchal V. Quantitative analysis of human herpesvirus-8 viral load using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1404–1408.
- 13 VanDevanter DR, Warren P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM. Detection and analysis of diverse herpes viral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 1666–1671.
- 14 Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrovsky S, McCallum CM, Henikoff S. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 1628–1635.
- 15 Rose TM, Strand KB, Schultz ER, Schaefer G, Rankin GW, Thoulless ME, Tsai CC, Bosch ML. Identification of two homologs of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 in retroperitoneal fibromatosis of different macaque species. *J Virol* 1997; **71**: 4138–4144.
- 16 Quackenbush SL, Work TM, Balazs GH, Casey RN, Rovnak J, Chaves A, duToit L, Baines JD, Parrish CR, Bowser PR, Casey JW. Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology* 1998; **246**: 392–399.
- 17 Rovnak J, Quackenbush SL, Reyes RA, Baines JD, Parrish CR, Casey JW. Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus. *J Virol* 1998; **72**: 4237–4242.
- 18 Donehower LA, Bohannon RC, Ford RJ, Gibbs RA. The use of primers from highly conserved pol regions to identify uncharacterized retroviruses by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1990; **28**: 33–46.
- 19 Kinlen LJ, Balkwill A. Infective cause of childhood leukemia and wartime population mixing in Orkney and Shetland, UK. *Lancet* 2001; **357**: 858.
- 20 Greaves M. Childhood leukemia. *Br Med J* 2002; **324**: 283–287.
- 21 European Group for the Immunological classification of acute Leukemias (EGIL): Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995; **9**: 1783–1786.
- 22 Garand R, Robillard N. Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classification. *Hematol Cell Ther* 1996; **38**: 471–486.
- 23 Chevallier P, Penhert D, Avet-Loiseau H, Robillard N, Ifrah N, Mahé B, Hamidou M, Maisonneuve H, Moreau P, Jardel H, Harousseau JL, Bataille R, Garand R. CD138 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2002; **116**: 142–150.
- 24 Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Marco JG, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; **8**: 1640–1645.
- 25 Challine D, Roudot-Thoraval F, Sarah T, Iaparche I, Brisson B, Mauberguez S, Dubernet F, Rigot P, Lefrere F, Mercier B, Brossard Y, Rouet F, Giro R, Loiseau P, Girard D, Claquin J, Loty B, Lerable J, Mariotti M, Pawlotsky JM, Lefrere JJ. Seroprevalence of human herpesvirus 8 antibody in populations at high or low risk of transfusion, graft, or sexual transmission of viruses. *Transfusion* 2001; **41**: 1120–1125.
- 26 Lennett ET, Blackbourne DJ, Levy JA. Antibodies to HHV type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 1996; **348**: 858–861.
- 27 Hermouet S, Corre I, Gassin M, Bigot-Corbel E, Sutton CA, Casey JW. Implication of hepatitis C virus (HCV) and human herpesvirus-8 (HHV-8) in the pathogenesis of a case of aggressive primary plasma cell leukemia (PCL). *N Engl J Med* (in press).

- 28 Black JB, Pellett PE. Human herpesvirus 7. *Rev Med Virol* 1999; **9**: 245–262.
- 29 Di Luca D, Dolcetti R, Miranda P, De Re V, Seccherio P, Carbone A, Boiocchi M, Cassai E. Human herpesvirus 6: a survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders. *J Infect Dis* 1994; **170**: 211–215.
- 30 Luppi M, Barozzi P, Morris C, Maiorana A, Garber R, Bonacorsi G, Donelli A, Marasca R, Tabilio A, Torelli G. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors *in vivo*. *J Virol* 1999; **73**: 754–759.
- 31 Dominici M, Luppi M, Campioni D, Lanza F, Barozzi P, Milani R, Moretti S, Nadali G, Spanedda R, Trovato R, Torelli G, Castoldi G. PCR with degenerate primers for highly conserved DNA polymerase gene of the herpesvirus family shows neither human herpesvirus-8 nor a related variant in bone marrow stromal cells from multiple myeloma patients. *Int J Cancer* 2000; **86**: 76–82.
- 32 Pan L, Milligan L, Michaeli J, Cesarman E, Knowles DM. Polymerase-chain reaction detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-optimized protocols and their application to myeloma. *J Mol Diagn* 2001; **3**: 32–38.
- 33 Erlach KC, Podlech J, Rojan A, Reddehase MJ. Tumor control in a model of bone marrow transplantation and acute liver-infiltrating B-cell lymphoma: an unpredicted novel function of cytomegalovirus. *J Virol* 2002; **76**: 2857–2870.
- 34 Vieira J, O'Hearn P, Kimball L, Chandran B, Corey L. Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human cytomegalovirus. *J Virol* 2001; **75**: 1378–1386.
- 35 Galloway DA, McDougall JK. The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a 'hit-and-run' mechanism. *Nature* 1983; **302**: 21–24.
- 36 Shen Y, Zhu H, Shen T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate 'hit-and-run' oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3341–3345.
- 37 Luppi M, Barozzi P, Schulz TF, Setti G, Staskus K, Trovato R, Narni F, Donelli A, Maiorana A, Marasca R, Sandrini S, Torelli G. Bone marrow failure associated with human herpesvirus-8 infection after transplantation. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1378–1385.
- 38 Luppi M, Barozzi P, Schulz TF, Trovato R, Setti G, Donelli A, Narni F, Sheldon J, Marasca R, Torelli G. Nonmalignant disease associated with human herpesvirus-8 reactivation in patients who have undergone autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2000; **96**: 2355–2357.
- 39 Ljungman P, Wang FZ, Clark DA, Emery VC, Remberger M, Ringden O, Linde A. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 2000; **111**: 774–781.
- 40 Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logman S, Kuenen-Boumeester V, Lowenberg B, Cornelissen JJ. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell depleted stem cell transplantation. *Blood* 2000; **95**: 2240–2245.
- 41 Cornelissen JJ, Carston M, King R, Dekker AW, Lowenberg B, Anasetti C. Unrelated marrow transplantation for adult patients with poor-risk acute lymphoblastic leukemia: strong graft-versus-leukemia effect and risk factors determining outcome. *Blood* 2001; **97**: 1572–1577.
- 42 van Esser JW, van der Holt B, Meijer E, Niester HG, Trensche R, Thijsen SF, van Loon AM, Frasson F, Bacigalupo A, Schaefer UW, Osterhaus AD, Gratama JW, Lowenberg B, Verdonck LF, Cornelissen JJ. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT. *Blood* 2001; **98**: 972–978.
- 43 Nanbo A, Inoue K, Adachi-Takasawa K, Takada K. Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon α induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J* 2002; **21**: 954–965.
- 44 Cao SJ, Kingsley L, Hoover DR, Spira TJ, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, Detels R, Parry P, Chang Y, Moore P. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 1996; **335**: 233–241.
- 45 Hisada M, Biggar RJ, Greene MH, Fraumeni JF, Travis LB. Solid tumors after chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**: 1979–1981.
- 46 MacKenzie J, Gallagher A, Clayton RA, Perry J, Eden OB, Ford AM, Greaves MF, Jarrett RF. Screening for herpesvirus genomes in common acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; **15**: 415–421.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Age Group	Pathology		Age (yr)	ebv	cmv	hhv6b	hhv7	hhv8	hhv1	hhv2	vzv
1	Astrocytoma	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23
		Mediana	13	0	0	0	0	0	0	0	0
		Min	1,4	0	0	0	0	0	0	0	0
		Max	19	22	6,5	0	0	1,6	1	0	45
		% Astrocytoma	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%	71,88%
	Control	N	1	1	1	0	0	0	1	1	1
		Mediana	0,6	7,3	0	-	-	-	0	0	0
		Min	0,6	7,3	0	-	-	-	0	0	0
		Max	0,6	7,3	0	-	-	-	0	0	0
		% Control	10,00%	11,11%	12,50%	0,00%	0,00%	0,00%	10,00%	10,00%	10,00%
2	Astrocytoma	N	9	9	9	9	9	9	9	9	9
		Mediana	29	0	0	0	0	0	0	0	0
		Min	20	0	0	0	0	0	0	0	0
		Max	59	3,7	0	0	7,1	0	0	0	0
		% Astrocytoma	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%	28,13%
	Control	N	9	8	7	6	6	6	9	9	9
		Mediana	59	3,1	0	0	0	0	0	0	0
		Min	21	0	0	0	0	0	0	0	0
		Max	89	21	0	0	0	0	4,6	99	0
		% Control	90,00%	88,89%	87,50%	100,00%	100,00%	100,00%	90,00%	90,00%	90,00%
All	Astrocytoma	N	32	32	32	32	32	32	32	32	32
		Mediana	15,5	0	0	0	0	0	0	0	0
		Min	1,4	0	0	0	0	0	0	0	0
		Max	59	22	6,5	0	7,1	1,6	1	0	45
		% Total	76,19%	78,05%	80,00%	84,21%	84,21%	84,21%	76,19%	76,19%	76,19%
	Control	N	10	9	8	6	6	6	10	10	10
		Mediana	51,5	3,3	0	0	0	0	0	0	0
		Min	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0
		Max	89	21	0	0	0	0	4,6	99	0
		% Total	23,81%	21,95%	20,00%	15,79%	15,79%	15,79%	23,81%	23,81%	23,81%
TOTAL			42	41	40	38	38	38	42	42	42

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 407

The FREQ Procedure

Table of ebv by astro

ebv astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
não	2	27	29	
	4.88	65.85	70.73	
	6.90	93.10		
	22.22	84.38		
sim	7	5	12	
	17.07	12.20	29.27	
	58.33	41.67		
	77.78	15.63		
Total	9	32	41	
	21.95	78.05	100.00	

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 9.594E-04

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col1 Risk)	0.1182	0.0286	0.4892
Cohort (Col2 Risk)	2.2345	1.1357	4.3963

Effective Sample Size = 41

Frequency Missing = 1

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 409

The FREQ Procedure

Table of cmv by astro

cmv astro

Frequency
Percent
Row Pct
Col Pct não sim Total
-----+-----+-----+
não 8 31 39
20.00 77.50 97.50
20.51 79.49
100.00 96.88
-----+-----+-----+
sim 0 1 1
0.00 2.50 2.50
0.00 100.00
0.00 3.13
-----+-----+-----+
Total 8 32 40
20.00 80.00 100.00

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.7949 0.6777 0.9323

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 411

The FREQ Procedure

Table of hh6b by astro

hh6b astro

Frequency
Percent
Row Pct
Col Pct não sim Total
-----+-----+-----+
não 6 32 38
15.79 84.21 100.00
15.79 84.21
100.00 100.00
-----+-----+-----+
Total 6 32 38
15.79 84.21 100.00

Table of hhv7 by astro

hhv7 astro

Frequency
Percent
Row Pct
Col Pct não sim Total
-----+-----+-----+
não 6 31 37
15.79 81.58 97.37
16.22 83.78
100.00 96.88
-----+-----+-----+
sim 0 1 1
0.00 2.63 2.63
0.00 100.00
0.00 3.13
-----+-----+-----+
Total 6 32 38
15.79 84.21 100.00

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.8378 0.7271 0.9654

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 414

The FREQ Procedure

Table of hhv8 by astro

hhv8 astro

Frequency
Percent
Row Pct
Col Pct não sim Total
-----+-----+-----+
não 6 31 37
15.79 81.58 97.37
16.22 83.78
100.00 96.88

```

-----+-----+-----+
sim | 0 | 1 | 1
| 0.00 | 2.63 | 2.63
| 0.00 | 100.00 |
| 0.00 | 3.13 |
-----+-----+-----+
Total 6 32 38
15.79 84.21 100.00

```

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.8378 0.7271 0.9654

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 416

The FREQ Procedure

Table of hhv1 by astro

hhv1 astro

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct | não | sim | Total
-----+-----+-----+
não | 9 | 31 | 40
| 21.43 | 73.81 | 95.24
| 22.50 | 77.50 |
| 90.00 | 96.88 |
-----+-----+-----+
sim | 1 | 1 | 2
| 2.38 | 2.38 | 4.76
| 50.00 | 50.00 |
| 10.00 | 3.13 |
-----+-----+-----+
Total 10 32 42
23.81 76.19 100.00

```

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 0.4239

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col1 Risk) 0.4500 0.1004 2.0178
Cohort (Col2 Risk) 1.5500 0.3838 6.2600

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 418

The FREQ Procedure

Table of hhv2 by astro

hhv2 astro

Frequency	Percent	Row Pct	Col Pct	não	sim	Total
não	9	32	41	21.43	76.19	97.62
	21.95	78.05		90.00	100.00	
sim	1	0	1	2.38	0.00	2.38
	100.00	0.00		10.00	0.00	
Total	10	32	42	23.81	76.19	100.00

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 0.2381

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col1 Risk) 0.2195 0.1233 0.3910

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 420

The FREQ Procedure

Table of vzv by astro

vzv astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
	-----+-----+-----+			
não	10	30	40	
	23.81	71.43	95.24	
	25.00	75.00		
	100.00	93.75		
	-----+-----+-----+			
sim	0	2	2	
	0.00	4.76	4.76	
	0.00	100.00		
	0.00	6.25		
	-----+-----+-----+			
Total	10	32	42	
23.81	76.19	100.00		

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.7500 0.6271 0.8969

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 422

13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=1 -----

The FREQ Procedure

Table of ebv by astro

ebv astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
	-----+-----+-----+			
não	0	19	19	
	0.00	79.17	79.17	
	0.00	100.00		
	0.00	82.61		

```

-----+-----+-----+
sim | 1 | 4 | 5
| 4.17 | 16.67 | 20.83
| 20.00 | 80.00 |
| 100.00 | 17.39 |
-----+-----+-----+
Total 1 23 24
4.17 95.83 100.00

```

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 0.2083

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 1.2500 0.8064 1.9375

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 424
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=1 -----

The FREQ Procedure

Table of cmv by astro

cmv astro

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct |não |sim | Total
-----+-----+-----+
não | 1 | 22 | 23
| 4.17 | 91.67 | 95.83
| 4.35 | 95.65 |
| 100.00 | 95.65 |
-----+-----+-----+
sim | 0 | 1 | 1
| 0.00 | 4.17 | 4.17
| 0.00 | 100.00 |
| 0.00 | 4.35 |
-----+-----+-----+
Total 1 23 24
4.17 95.83 100.00

```

```

Fisher's Exact Test
-----
Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits
-----
Cohort (Col2 Risk) 0.9565 0.8767 1.0436

```

```

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 426
13:33 Monday, January 20, 2003

```

```

----- age=1 -----

```

```

The FREQ Procedure

Table of hh6b by astro

hh6b astro

```

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct | não | sim | Total
-----+-----+-----+
não | 0 | 23 | 23
| 0.00 | 100.00 | 100.00
| 0.00 | 100.00 |
| . | 100.00 |
-----+-----+-----+
Total 0 23 23
0.00 100.00 100.00

```

```

Table of hhv7 by astro

hhv7 astro

```

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct | não | sim | Total
-----+-----+-----+
não | 0 | 23 | 23
| 0.00 | 100.00 | 100.00
| 0.00 | 100.00 |
| . | 100.00 |
-----+-----+-----+
Total 0 23 23
0.00 100.00 100.00

```

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 427
 13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=1 -----

The FREQ Procedure

Table of hhv8 by astro

hhv8 astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+				
não 0 22 22				
0.00 95.65 95.65				
0.00 100.00				
. 95.65				
-----+-----+-----+				
sim 0 1 1				
0.00 4.35 4.35				
0.00 100.00				
. 4.35				
-----+-----+-----+				
Total 0 23 23				
0.00 100.00 100.00				

Row or column sum zero. No statistics computed for this table.

Table of hhv1 by astro

hhv1 astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+				
não 1 22 23				
4.17 91.67 95.83				
4.35 95.65				
100.00 95.65				
-----+-----+-----+				
sim 0 1 1				
0.00 4.17 4.17				
0.00 100.00				
0.00 4.35				
-----+-----+-----+				
Total 1 23 24				

4.17 95.83 100.00

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.9565 0.8767 1.0436

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 431
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=1 -----

The FREQ Procedure

Table of hhv2 by astro

hhv2 astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+				
não 1 23 24				
4.17 95.83 100.00				
4.17 95.83				
100.00 100.00				
-----+-----+-----+				
Total 1 23 24				
4.17 95.83 100.00				

Table of vzv by astro

vzv astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+				
não 1 21 22				
4.17 87.50 91.67				
4.55 95.45				
100.00 91.30				
-----+-----+-----+				
sim 0 2 2				

	0.00		8.33		8.33
	0.00		100.00		
	0.00		8.70		

-----+-----+-----+
Total 1 23 24
4.17 95.83 100.00

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.9545 0.8714 1.0457

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 434
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----
The FREQ Procedure

Table of ebv by astro

ebv astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	

-----+-----+-----+
não | 2 | 8 | 10
| 11.76 | 47.06 | 58.82
| 20.00 | 80.00 |
| 25.00 | 88.89 |
-----+-----+-----+
sim | 6 | 1 | 7
| 35.29 | 5.88 | 41.18
| 85.71 | 14.29 |
| 75.00 | 11.11 |
-----+-----+-----+
Total 8 9 17
47.06 52.94 100.00

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 0.0152

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col1 Risk) 0.2333 0.0651 0.8358
Cohort (Col2 Risk) 5.6000 0.8886 35.2905

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 437
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The FREQ Procedure

Table of cmv by astro

cmv astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+				
não 7 9 16				
43.75 56.25 100.00				
43.75 56.25				
100.00 100.00				
-----+-----+-----+				
Total 7 9 16				
43.75 56.25 100.00				

Table of hh6b by astro

hh6b astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+				
não 6 9 15				
40.00 60.00 100.00				
40.00 60.00				
100.00 100.00				
-----+-----+-----+				
Total 6 9 15				
40.00 60.00 100.00				

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 438
 13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The FREQ Procedure

Table of hhv7 by astro

hhv7 astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+-----+-----				
não	6	8	14	
	40.00	53.33	93.33	
	42.86	57.14		
	100.00	88.89		
-----+-----+-----+-----+-----				
sim	0	1	1	
	0.00	6.67	6.67	
	0.00	100.00		
	0.00	11.11		
-----+-----+-----+-----+-----				
Total	6	9	15	
	40.00	60.00	100.00	

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.5714 0.3630 0.8994

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 441
 13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The FREQ Procedure

Table of hhv8 by astro

hhv8 astro

Frequency	Percent	Row Pct	Col Pct	não	sim	Total
-----+-----+-----+						
não	6	9	15			
	40.00	60.00	100.00			
	40.00	60.00				
	100.00	100.00				
-----+-----+-----+						
Total	6	9	15			
40.00	60.00	100.00				

Table of hhv1 by astro

hhv1 astro

Frequency	Percent	Row Pct	Col Pct	não	sim	Total
-----+-----+-----+						
não	8	9	17			
	44.44	50.00	94.44			
	47.06	52.94				
	88.89	100.00				
-----+-----+-----+						
sim	1	0	1			
	5.56	0.00	5.56			
	100.00	0.00				
	11.11	0.00				
-----+-----+-----+						
Total	9	9	18			
50.00	50.00	100.00				

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col1 Risk) 0.4706 0.2842 0.7791

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 444

13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The FREQ Procedure

Table of hhv2 by astro

hhv2 astro

Frequency			
Percent			
Row Pct			
Col Pct	não	sim	Total
-----+-----+-----+			
não 8 9 17			
44.44 50.00 94.44			
47.06 52.94			
88.89 100.00			
-----+-----+-----+			
sim 1 0 1			
5.56 0.00 5.56			
100.00 0.00			
11.11 0.00			
-----+-----+-----+			
Total 9 9 18			
50.00 50.00 100.00			

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col1 Risk) 0.4706 0.2842 0.7791

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 446
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The FREQ Procedure

Table of vzv by astro

vzv astro

Frequency			
Percent			
Row Pct			
Col Pct	não	sim	Total
-----+-----+-----+			

```

nãõ | 9 | 9 | 18
| 50.00 | 50.00 | 100.00
| 50.00 | 50.00 |
| 100.00 | 100.00 |
-----+-----+-----+
Total 9 9 18
50.00 50.00 100.00

```

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 447

----- sexo=F -----

The FREQ Procedure

Table of ebv by astro

ebv astro

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct |nãõ |sim | Total
-----+-----+-----+
nãõ | 2 | 12 | 14
| 9.52 | 57.14 | 66.67
| 14.29 | 85.71 |
| 40.00 | 75.00 |
-----+-----+-----+
sim | 3 | 4 | 7
| 14.29 | 19.05 | 33.33
| 42.86 | 57.14 |
| 60.00 | 25.00 |
-----+-----+-----+
Total 5 16 21
23.81 76.19 100.00

```

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 0.2800

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

```

Cohort (Col1 Risk) 0.3333 0.0713 1.5581
Cohort (Col2 Risk) 1.5000 0.7628 2.9497

```

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 450

----- sexo=F -----

The FREQ Procedure

Table of cmv by astro

cmv astro

Frequency			
Percent			
Row Pct			
Col Pct	não	sim	Total
-----+-----+-----+			
não	5	15	20
	23.81	71.43	95.24
	25.00	75.00	
	100.00	93.75	
-----+-----+-----+			
sim	0	1	1
	0.00	4.76	4.76
	0.00	100.00	
	0.00	6.25	
-----+-----+-----+			
Total	5	16	21
	23.81	76.19	100.00

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.7500 0.5823 0.9659

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 453

----- sexo=F -----

The FREQ Procedure

Table of hh6b by astro

hh6b astro

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct | não | sim | Total
-----+-----+-----+
não | 3 | 16 | 19
| 15.79 | 84.21 | 100.00
| 15.79 | 84.21 |
| 100.00 | 100.00 |
-----+-----+-----+
Total 3 16 19
15.79 84.21 100.00

```

Table of hhv7 by astro

hhv7 astro

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct | não | sim | Total
-----+-----+-----+
não | 3 | 15 | 18
| 15.79 | 78.95 | 94.74
| 16.67 | 83.33 |
| 100.00 | 93.75 |
-----+-----+-----+
sim | 0 | 1 | 1
| 0.00 | 5.26 | 5.26
| 0.00 | 100.00 |
| 0.00 | 6.25 |
-----+-----+-----+
Total 3 16 19
15.79 84.21 100.00

```

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.8333 0.6778 1.0246

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 456

----- sexo=F -----

The FREQ Procedure

Table of hhv8 by astro

hhv8 astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+				
não 3 16 19				
15.79 84.21 100.00				
15.79 84.21				
100.00 100.00				
-----+-----+-----+				
Total 3 16 19				
15.79 84.21 100.00				

Table of hhv1 by astro

hhv1 astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+				
não 5 15 20				
22.73 68.18 90.91				
25.00 75.00				
83.33 93.75				
-----+-----+-----+				
sim 1 1 2				
4.55 4.55 9.09				
50.00 50.00				
16.67 6.25				
-----+-----+-----+				
Total 6 16 22				
27.27 72.73 100.00				

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 0.4805

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study	Value	95% Confidence Limits	

Cohort (Col1 Risk)	0.5000	0.1030 2.4279	
Cohort (Col2 Risk)	1.5000	0.3666 6.1366	

----- sexo=F -----

The FREQ Procedure

Table of hhv2 by astro

hhv2 astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+				
não 6 16 22				
27.27 72.73 100.00				
27.27 72.73				
100.00 100.00				
-----+-----+-----+				
Total 6 16 22				
27.27 72.73 100.00				

Table of vzv by astro

vzv astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
-----+-----+-----+				
não 6 16 22				
27.27 72.73 100.00				
27.27 72.73				
100.00 100.00				
-----+-----+-----+				
Total 6 16 22				
27.27 72.73 100.00				

----- sexo=M -----

The FREQ Procedure

Table of ebv by astro

ebv astro

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct |não |sim | Total
-----+-----+-----+
não | 0 | 15 | 15
| 0.00 | 75.00 | 75.00
| 0.00 | 100.00 |
| 0.00 | 93.75 |
-----+-----+-----+
sim | 4 | 1 | 5
| 20.00 | 5.00 | 25.00
| 80.00 | 20.00 |
| 100.00 | 6.25 |
-----+-----+-----+
Total 4 16 20
20.00 80.00 100.00

Fisher's Exact Test
-----
Two-sided Pr <= P 0.0010

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits
-----
Cohort (Col2 Risk) 5.0000 0.8662 28.8608

```

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 462

----- sexo=M -----

The FREQ Procedure

Table of cmv by astro

cmv astro

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct |não |sim | Total
-----+-----+-----+
não | 3 | 16 | 19
| 15.79 | 84.21 | 100.00
| 15.79 | 84.21 |
| 100.00 | 100.00 |
-----+-----+-----+
Total 3 16 19
15.79 84.21 100.00

```

Table of hh6b by astro

hh6b astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
não 3 16 19				
15.79 84.21 100.00				
15.79 84.21				
100.00 100.00				
Total 3 16 19				
15.79 84.21 100.00				

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 463

----- sexo=M -----

The FREQ Procedure

Table of hhv7 by astro

hhv7 astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
não 3 16 19				
15.79 84.21 100.00				
15.79 84.21				
100.00 100.00				
Total 3 16 19				
15.79 84.21 100.00				

Table of hhv8 by astro

hhv8 astro

Frequency				
Percent				
Row Pct				
Col Pct	não	sim	Total	
não 3 15 18				

	15.79	78.95	94.74
	16.67	83.33	
	100.00	93.75	

sim	0	1	1
	0.00	5.26	5.26
	0.00	100.00	
	0.00	6.25	

Total	3	16	19
	15.79	84.21	100.00

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.8333 0.6778 1.0246

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 466

----- sexo=M -----

The FREQ Procedure

Table of hhv1 by astro

hhv1 astro

Frequency			
Percent			
Row Pct			
Col Pct	não	sim	Total

não	4	16	20
	20.00	80.00	100.00
	20.00	80.00	
	100.00	100.00	

Total	4	16	20
	20.00	80.00	100.00

Table of hhv2 by astro

hhv2 astro

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct |não |sim | Total
-----+-----+-----+
não | 3 | 16 | 19
| 15.00 | 80.00 | 95.00
| 15.79 | 84.21 |
| 75.00 | 100.00 |
-----+-----+-----+
sim | 1 | 0 | 1
| 5.00 | 0.00 | 5.00
| 100.00 | 0.00 |
| 25.00 | 0.00 |
-----+-----+-----+
Total 4 16 20
20.00 80.00 100.00

Fisher's Exact Test
-----
Two-sided Pr <= P 0.2000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits
-----
Cohort (Coll Risk) 0.1579 0.0559 0.4460

```

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 469

----- sexo=M -----

The FREQ Procedure

Table of vzv by astro

vzv astro

```

Frequency|
Percent |
Row Pct |
Col Pct |não |sim | Total
-----+-----+-----+
não | 4 | 14 | 18
| 20.00 | 70.00 | 90.00
| 22.22 | 77.78 |
| 100.00 | 87.50 |
-----+-----+-----+
sim | 0 | 2 | 2
| 0.00 | 10.00 | 10.00
| 0.00 | 100.00 |

```

	0.00	12.50	
-----+-----+-----+			
Total	4	16	20
	20.00	80.00	100.00

Fisher's Exact Test

Two-sided Pr <= P 1.0000

Estimates of the Relative Risk (Row1/Row2)

Type of Study Value 95% Confidence Limits

Cohort (Col2 Risk) 0.7778 0.6076 0.9956

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 471

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable ebv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean

astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 9 274.0 189.0 25.524737 30.444444

sim 32 587.0 672.0 25.524737 18.343750

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.0009

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 472

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable cmv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean

astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 8 160.0 164.0 8.0 20.0000

sim 32 660.0 656.0 8.0 20.6250

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.6171

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 473

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hh6b_c
Classified by Variable astro

	Sum of	Expected	Std Dev	Mean
astro	N	Scores	Under H0	Under H0
			Score	Score

não	6	117.0	117.0	0.0	19.50
sim	32	624.0	624.0	0.0	19.50

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 474

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv7_c
Classified by Variable astro

	Sum of	Expected	Std Dev	Mean
astro	N	Scores	Under H0	Under H0
			Score	Score

não	6	114.0	117.0	6.928203	19.000000
sim	32	627.0	624.0	6.928203	19.593750

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.6650

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 475

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv8_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não	6	114.0	117.0	6.928203	19.000000
sim	32	627.0	624.0	6.928203	19.593750

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.6650

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 476

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv1_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não	10	226.50	215.0	12.497619	22.650000
sim	32	676.50	688.0	12.497619	21.140625

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.3575

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 477

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv2_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean

astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 10 231.0 215.0 8.944272 23.10
sim 32 672.0 688.0 8.944272 21.00

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.0736

Todos - sem Grupos 13:33 Monday, January 20, 2003 478

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable vzv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 10 205.0 215.0 12.497619 20.50000
sim 32 698.0 688.0 12.497619 21.81250

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.4236

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 479
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=1 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable eby_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 1 23.0 12.50 4.915960 23.000000
sim 23 277.0 287.50 4.915960 12.043478

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.0327

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 480
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=1 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable cmv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 1 12.0 12.50 2.397916 12.000000
sim 23 288.0 287.50 2.397916 12.521739

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.8348

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 481
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=1 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv1_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 1 12.0 12.50 2.397916 12.000000
sim 23 288.0 287.50 2.397916 12.521739

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.8348

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 482
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=1 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv2_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 1 12.50 12.50 0.0 12.50
sim 23 287.50 287.50 0.0 12.50

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 483
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=1 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable vzv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 1 11.50 12.50 3.319764 11.500000
sim 23 288.50 287.50 3.319764 12.543478

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.7632

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 484
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable ebv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 8 95.0 72.0 9.282336 11.875000
sim 9 58.0 81.0 9.282336 6.444444

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.0132

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 485
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable cmv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 7 59.50 59.50 0.0 8.50
sim 9 76.50 76.50 0.0 8.50

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 486
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hh6b_c
Classified by Variable astro

```

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score
-----
não 6 48.0 48.0 0.0 8.0
sim 9 72.0 72.0 0.0 8.0

```

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 487
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv7_c
Classified by Variable astro

```

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score
-----
não 6 45.0 48.0 3.674235 7.500000
sim 9 75.0 72.0 3.674235 8.333333

```

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.4142

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 488
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv8_c
Classified by Variable astro

```

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score
-----
não 6 48.0 48.0 0.0 8.0
sim 9 72.0 72.0 0.0 8.0

```

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 489
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv1_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 9 90.0 85.50 4.50 10.0
sim 9 81.0 85.50 4.50 9.0

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.3173

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 490
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv2_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 9 90.0 85.50 4.50 10.0
sim 9 81.0 85.50 4.50 9.0

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.3173

Dois Grupos de Idades (<=19 e >=20) 491
13:33 Monday, January 20, 2003

----- age=2 -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable vzv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 9 85.50 85.50 0.0 9.50
sim 9 85.50 85.50 0.0 9.50

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 492

----- sexo=F -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable ebv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 5 68.0 55.0 10.165300 13.60000
sim 16 163.0 176.0 10.165300 10.18750

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.2009

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 493

----- sexo=F -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable cmv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 5 52.50 55.0 4.472136 10.500000
sim 16 178.50 176.0 4.472136 11.156250

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.5762

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 494

----- sexo=F -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hh6b_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 3 30.0 30.0 0.0 10.0
sim 16 160.0 160.0 0.0 10.0

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 495

----- sexo=F -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv7_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

```
não 3 28.50 30.0 3.464102 9.500000
sim 16 161.50 160.0 3.464102 10.093750
```

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.6650

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 496

----- sexo=F -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv8_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

```
não 3 30.0 30.0 0.0 10.0
sim 16 160.0 160.0 0.0 10.0
```

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 497

----- sexo=F -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv1_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

```
não 6 74.50 69.0 6.768913 12.416667
sim 16 178.50 184.0 6.768913 11.156250
```

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.4165

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 498

----- sexo=F -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv2_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 6 69.0 69.0 0.0 11.50
sim 16 184.0 184.0 0.0 11.50

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 499

----- sexo=F -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable vzv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

não 6 69.0 69.0 0.0 11.50
sim 16 184.0 184.0 0.0 11.50

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 500

----- sexo=M -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable ebv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

sim 16 140.0 168.0 8.052460 8.750
não 4 70.0 42.0 8.052460 17.500

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.0005

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 501

----- sexo=M -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable cmv_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

sim 16 160.0 160.0 0.0 10.0
não 3 30.0 30.0 0.0 10.0

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 502

----- sexo=M -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hh6b_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

sim 16 160.0 160.0 0.0 10.0

não 3 30.0 30.0 0.0 10.0

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 503

----- sexo=M -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv7_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

sim 16 160.0 160.0 0.0 10.0
não 3 30.0 30.0 0.0 10.0

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 504

----- sexo=M -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv8_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

sim 16 161.50 160.0 3.464102 10.093750
não 3 28.50 30.0 3.464102 9.500000

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.6650

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 505

----- sexo=M -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv1_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

sim 16 168.0 168.0 0.0 10.50
não 4 42.0 42.0 0.0 10.50

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 1.0000

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 506

----- sexo=M -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable hhv2_c
Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

sim 16 160.0 168.0 4.0 10.00
não 4 50.0 42.0 4.0 12.50

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.0455

Por Sexo 13:33 Monday, January 20, 2003 507

----- sexo=M -----

The NPAR1WAY Procedure

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable vzv_c

Classified by Variable astro

Sum of Expected Std Dev Mean
astro N Scores Under H0 Under H0 Score

sim 16 172.0 168.0 5.513620 10.750
não 4 38.0 42.0 5.513620 9.500

Average scores were used for ties.

Kruskal-Wallis Test

Pr > Chi-Square 0.4682 Descritivo por idades 16:57
Monday, January 20, 2003 3

----- age=1 -----

The MEANS Procedure

N
astro Obs Variable N Median Minimum Maximum

não 1 idade 1 0.6000000 0.6000000 0.6000000
ebv_c 1 7.3000000 7.3000000 7.3000000
cmv_c 1 0 0 0
hh6b_c 0 . . .
hhv7_c 0 . . .
hhv8_c 0 . . .
hhv1_c 1 0 0 0
hhv2_c 1 0 0 0
vzv_c 1 0 0 0

sim 23 idade 23 13.0000000 1.4000000 19.0000000
ebv_c 23 0 0 22.0000000
cmv_c 23 0 0 6.5000000
hh6b_c 23 0 0 0
hhv7_c 23 0 0 0
hhv8_c 23 0 0 1.6000000
hhv1_c 23 0 0 1.0000000
hhv2_c 23 0 0 0
vzv_c 23 0 0 45.0000000

----- age=2 -----

N
astro Obs Variable N Median Minimum Maximum

não 9 idade 9 59.0000000 21.0000000 89.0000000
ebv_c 8 3.1000000 0 21.0000000
cmv_c 7 0 0 0
hh6b_c 6 0 0 0
hhv7_c 6 0 0 0
hhv8_c 6 0 0 0

```

hhv1_c 9 0 0 4.6000000
hhv2_c 9 0 0 99.0000000
vzv_c 9 0 0 0

sim 9 idade 9 29.0000000 20.0000000 59.0000000
ebv_c 9 0 0 3.7000000
cmv_c 9 0 0 0
hh6b_c 9 0 0 0
hhv7_c 9 0 0 7.1000000
hhv8_c 9 0 0 0
hhv1_c 9 0 0 0

```

Descritivo para Tudo 17:49 Monday, January 20, 2003 1

The MEANS Procedure

```

N
astro Obs Variable N Median Minimum Maximum
-----
não 10 idade 10 51.5000000 0.6000000 89.0000000
ebv_c 9 3.3000000 0 21.0000000
cmv_c 8 0 0 0
hh6b_c 6 0 0 0
hhv7_c 6 0 0 0
hhv8_c 6 0 0 0
hhv1_c 10 0 0 4.6000000
hhv2_c 10 0 0 99.0000000
vzv_c 10 0 0 0

sim 32 idade 32 15.5000000 1.4000000 59.0000000
ebv_c 32 0 0 22.0000000
cmv_c 32 0 0 6.5000000
hh6b_c 32 0 0 0
hhv7_c 32 0 0 7.1000000
hhv8_c 32 0 0 1.6000000
hhv1_c 32 0 0 1.0000000
hhv2_c 32 0 0 0
vzv_c 32 0 0 45.0000000

```

APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA



HOSPITAL DISTRITAL DE FARO

Ministério da Saúde

COMISSÃO DE ÉTICA

PARECER N° 19/2000

ASSUNTO: Implicações Imunobiológicas da Infecção por Herpesvirus em Tumores Malignos Infantis

Serviço: Pediatria

Investigador Principal: Ana Margarida Sameiro Moutinho Neves Pereira de Castro

Em reunião da CES-HDF de _7/12/00 foi analisado o estudo acima mencionado a realizar no HDF em colaboração com outros hospitais, Fac. De Ciências Médicas da Univ. Nova de Lisboa e Cornell University dos USA.

Concordando com o interesse e importância de que se reveste a realização deste Estudo, verificamos que observa as normas de boa prática clínica, nada havendo a opor sob o ponto de vista ético.

Assim somos da opinião que o estudo seja autorizado.

H.D.Faro _7_ de _Dezembro_ de _2000_

A Comissão de Ética para a Saúde

HDF

INFORMAÇÃO PARA O DOENTE/ CONSENTIMENTO INFORMADO

Informação para o doente e pais

Introdução: Gostaríamos que o seu filho participasse num estudo de investigação com o objectivo de pesquisar a eventual origem viral de algumas doenças hematológicas.

Se não pretenderem participar, tal facto não irá afectar a qualidade do tratamento que o seu filho irá receber.

Alguns tipos de vírus podem estar envolvidos na oncogenese. O vírus de Epstein Barr (EBV) foi já comprovadamente identificado como causador de alguns tipos de tumores.

O Objectivo do trabalho é tentar encontrar o vírus através de modernas técnicas de Biologia Molecular (PCR Quantitativa) e de determinações serológicas (Anticorpos contra o EBV) através de uma análise de sangue, no início da doença.

Os Benefícios directos para o seu filho resultam da eventual identificação e melhor compreensão dos efeitos da infecção pelo EBV no processo da doença. Os benefícios indirectos serão o aumento de conhecimentos respeitantes a este tipo de doenças.

A Participação é totalmente voluntária sendo livres de desistir em qualquer altura.

Consentimento Informado

Consentimento Informado:

No centro hospitalar: _____

Eu, _____

(Nome do Pai, da Mãe ou do tutor legal, LETRA DE IMPRENSA)

li a informação em anexo, e tendo conversado com o Dr. _____

sobre o estudo a que se refere entendi os objectivos e métodos do estudo.

Autorizo que o meu filho,

(Nome da criança, LETRA DE IMPRENSA)

participe no estudo.

Assinatura do pai, da mãe ou do tutor legal

Data

Eu, _____

(Nome do Investigador, LETRA DE IMPRENSA)

expliquei a natureza e objectivo do estudo a:

(Nome do Pai, da Mãe ou do tutor legal, LETRA DE IMPRENSA)

e ao seu filho,

(Nome da criança, LETRA DE IMPRENSA)

Assinatura do Investigador

Data

BIBLIOGRAFIA

Adamson AL. (2005) Epstein-Barr Virus BZLF1 protein binds to mitotic chromosomes. *J Virol* 79: 7899-904.

Alfaro M, Tapadinhas F, Campos T, Neves AM. (2008) Hospitalizações de crianças por varicela complicada no sotavento algarvio - 1993-2003. *Infeção e Sepsis* 4: 17-23.

Al Mehairi S, Cerasoli E, Sinclair AJ. (2005) Investigation of the multimerization region of the Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) ProteinK-bZip: the proposed Leucine zipper region encodes a multimerization domain with an unusual structure. *J Virol* 79 (12): 7905-10.

Ambinder R. (2003) Infection and lymphoma. *N Eng J Med* 349: 1309-11.

Amyes E, Hatton C, Montamat-Sicotte D, Gudgeon N, Rickinson A et al. (2003) Characterization of the CD4 T Cell Response to Epstein-Barr-Virus during Primary and Persistent Infection. *J Exp Med* 198: 903-911.

Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H. (1995) Morphology, immunophenotype and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr Virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of EBV. *Blood* 85: 744-50.

Anthony IC, Crawford DH, Bell JE. (2003) B lymphocytes in the normal brain: contrasts with HIV-associated lymphoid infiltrates and lymphomas. *Brain* 126: 1058-67.

Baer R, Bankier A, Biggin M et al. (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr Virus genome. *Nature* 310: 207-11.

Becher Y. (2002) Herpes Simplex Virus evolved to use the human defense mechanisms to establish a lifelong infection in neurons - a review and hypothesis. *Virus Genes* 24: 187- 196.

Black JB, Pellet PE. (1999) Human Herpesvirus 7. *Rev Med Virol* 9: 245-262.

Bonnet M, Ginebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, Joab I. (1999) Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 91: 1376-1381.

Borza CM, Hutt-Fletcher LM. (2002) Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus . *Nature Medicine* 8; 594-599.

Brouchet L, Valmary S, Dahan M, Didier A, Gallateau-Salle F, Brousset P, Degano B. (2005) Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *Br J Cancer* 92: 743-6.

Bruce J. (2006) Pilocytic astrocytoma.
http://en.wikipedia.org/wiki/Pilocytic_astrocytoma (10.01.2008).

Burkitt G, Stevens A, Lowe J, Young B. (eds) (1996) Wheather's Basic Histopathology. Churchill Livingstone: New York,

Campbell H. (1995) Acute Respiratory Infection: a Global Challenge. *Arch Dis Childhood* 73: 281-286.

Camilleri-Broet S, Camparo P, Mokhatari K, Hoang-Xuan KH, Martin A, Arborio M, Hauw JJ, Raphael M. (2000) Overexpression of Bcl-2, BCL-X, and BAX in primary central nervous system lymphomas that occur in immunosuppressed patients. *Mod Pathol* 13(2):158-65.

Cannon JS, Nicholas J, Orenstein JM, Mann RB, Murray PG, Browning PJ, DiGiuseppe JA, Cesarman E, Hayward GS, Ambinder RF. (1999) Heterogeneity of viral IL-6 expression in HHV-8-associated diseases. *J Infect Dis* 180: 824-28.

Casanova JL, Blanche S. (1997) Infection par le virus d'Epstein-Barr. In Mége JL (ed). Infection et Immunité. 237-42.

Casey JW. (1998) Detection of a novel bovine lymphotropic Herpesvirus. J Virology 72: 4237-4242.

Castro (Neves) AM, Vassal H, Cabeçadas J, Melo I, Figueiredo T, Melo Gomes J, Trindade JC. (1995) Doença de Castleman. A propósito de um caso clínico. Cad Imunoalergol Ped 19: 9-12.

Castro (Neves) AM, Vassal H, Cabeçadas J, Melo I, Figueiredo T, Melo Gomes J, Trindade JC (1995) A case of Castleman Disease (abstract). Proceedings of the AAACI (San Francisco), J Allergy Clin Immunol 99: S23.

Castro (Neves) AM. (1996) Infecções virais respiratórias na criança. Cad Imunoalergol Ped 11(4): 39-46.

Castro (Neves). ed. (1998) Contribuição para o estudo de alguns parâmetros da infecção pelo vírus de Epstein Barr na Criança (Tese de Mestrado) Lisboa.

Castro (Neves) AM, Mege JL, Mata PL, Pinto JR, Caetano JM. (1998) Anti-inflammatory role of cytokines in Epstein-Barr virus infection (abstract). Proceedings of the III International Congress on Pediatric Pulmonology.

Castro (Neves) AM. (1999) Vírus de Epstein Barr e subpopulações linfocitárias TH1-TH2. Cad Imunoalergol Ped 14: 18-21.

Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. (1995) Kaposi's sarcoma associated Herpesvirus- like DNA sequences in AIDS-related body- cavity- based- lymphomas. N Eng J Med 332: 1186-1191.

Cesarman E. (2003) Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus- the high cost of viral survival. N Eng J Med 349(12): 1107-9.

Chang Y, Cesarman E, Pessins MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. (1994) Identification of Herpesvirus-like DNA sequences in AIDS- associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266: 1865- 1869.

Chee MS, Bankier AT, Beck S et al. (1990) Analysis of protein- coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD 169. *Curr Top Microbiol Immunol* 154: 125.

Chu PG, Chang KL, Chen YY, Chen WG, Weiss LM. (2001) No significant association of Epstein- Barr Virus infection with invasive breast carcinoma. *Am J Pathol* 159: 571-78.

Chuck S, Grant RM, Katongole- Mbide, Conant M, Ganem D. (1996) Frequent presence of a novel Herpesvirus genome in lesions of human immuno- deficiency virus- negative Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis* 173: 248-251.

Clark DA, Kidd IM, Collingham KE et al. (1997) Diagnosis of primary Human Herpesvirus 6 and 7 Infections in febrile infants by Polymerase Chain Reaction. *Arch Dis Child* 77: 42-45.

Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, Nabors LB, Cobbs CG, Britt WJ. (2002) Human Cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* 62: 3347-50.

Cohen JI. (1997) Epstein- Barr virus and the immune system: hide and seek. *JAMA* 278: 510-3.

Cohen J. (1997) Inhibition of apoptosis by Herpesvirus. *Proceedings of 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) American Society for Microbiology Toronto.*

Cohen JI. (2000) Epstein-Barr Virus infection. *N Eng J Med* 343: 7: 481-492.

Collins M. (1995) Potential Roles of apoptosis in viral pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 152: S20-S24.

Colm Graham. (2008) A simplified diagram of HSV replication. http://en.wikipedia.org/wiki/Herpes_simplex_virus (15.10.2007).

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo V, Berneman Z. (2007) Regulatory T cells and Human Disease. *Clin Development Immunol* 10 1155: 1-11.

Crum CP. (2002) The beginning of the end for cervical cancer? *N Eng J Med* 347: 1703-05.

Crumpacker CS. (2004) Use of antiviral drugs to prevent Herpesvirus transmission. *N Eng J Med* 350: 11-20.

Davis N, Tang J, Ward N. (2004) Herpes simplex virus type 2 and recurrent meningitis. *Lancet* 364: 501-2.

Damania B. (2007) DNA tumor viruses and human cancer. *Trends Microbiology* 15(1): 38- 44.

Davison AJ, Scott JE. (1986) The complete DNA sequence of Varicella-zoster virus. *J Gen Virol* 67:1759.

Dell Valle L, Gordon J, Assimimakopoulou M, Enam S, Geddes JF, Varakis JN, Katsetos CD, Croul S, Khalili K. (2001) Detection of JC virus DNA sequences and expression of the viral regulatory protein T- antigen in tumours of the Central Nervous System. *Cancer Res* 15: 61: 4287-93.

Di Luca D, Mirandola P, De Re V et al. (1994) Human Herpesvirus 6: a survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders. *J Inf Dis* 170: 211-215.

Doniger J, Muralidhar S, Rosenthal LJ. (1999) Human Cytomegalovirus and Human Herpesvirus 6 Genes that transform and transactivate. *Clin Microbiol Rev* 12: 367-382.

Douglas KM, Gordon C, Osman H, Heaton S, Skan J, Situnayake D, Bowman SJ. (2003) Lupus and Zoster. *Lancet* 362(9384): 616.

Downey H, Stasney J. (1935) Infectious Mononucleosis. Hematologic Studies. JAMA; 105: 754.

Drexler M. (ed) (2002) Secret Agents: the menace of emerging infections. 1st Edition, National Academy of Sciences: Washington DC.

Dupin N, Grandadam M, Calvez V, Gorin I, Aubin JT, Havard S, Lamy F, Leibowitch M, Huraux JM, Escande JP, Agut H. (1995) Herpesvirus- like DNA sequences in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma. Lancet 345: 761- 762.

Duprez R, Lacoste V, Hermouet S, Troussard X, Valensi F, Merle-Beral H, Gessain A. (2004) Plasma-cell leukemia and Human Herpesvirus 8 infection. Leukemia 18(11): 1903-04.

Egan J, Barber L, Lomax J, Fox A, Yonan N, Rahman AN, Campbell CS, DeiraniyaAK, Carroll KB, Craske J, Turner A, Woodcock A. (1995) Detection of Human Cytomegalovirus antigenaemia: a rapid diagnostic technique for predicting Cytomegalovirus infection/pneumonitis in lung and heart transplant recipients. Thorax 50: 9-13.

Egan J, Stewart JP, Hasleton PS, Arrand JR, Carrol KB, Woodcock AA. (1995) Epstein-Barr replication within pulmonary epithelial cells in cryptogenic fibrosing alveolitis. Thorax 50: 1234-1239.

Ellerin TB, Walsh, Hooper DC. SR (2004) Recurrent meningitis of unknown aetiology. Lancet 363: 1772.

Epstein MA, Achong BG, Barr YM. (1964) Virus particles in cultural lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet; 1: 702-703.

Evans AS. (1972) Infectious Mononucleosis and other Mono-like Syndromes. New Eng J Med; 286: 836- 37.

Evans RJ, Willie FS, Wynford-Thomas D, Kipling D, Jones CJ. (2003) A P53- dependent, Telomere- independent proliferative life span barrier in human astrocytes consistent with the molecular genetics of glioma development. Cancer Res 63: 4854-61.

Farmer E. (2006) Cell Apoptosis.
<http://en.wikipedia.org/wiki/apoptosis> (10.01.2008).

Farmer E. (2006) Apoptosis activation by Fas ligand.
<http://en.wikipedia.org/wiki/apoptosis> (10.01.2008).

Flore O. (2004). Kaposi's Sarcoma. *Lancet* 364: 740-1.

Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS et al. (1990) Isolation of a new Herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 748.

Garcea RL, Imperiale MJ. (2003) Simian virus 40 infection of humans. *J Virol* 77: 5039-5045.

Gaspar J, Rodrigues S, Gil OM, Manita I, Ferreira TC, Limbert E, Gonçalves L, Pina JE, Rueff J. (2004) Combined effects of glutathione S-transferase polymorphisms and thyroid cancer risk. *Cancer Genetics Cytogenetics* 151: 60-67.

Gaur S et al. (1994) Clinical immunology and infectious diseases. *Pediatr Clin North Am* 41(4):745- 81.

Greenspan JS, Greenspan D, Lennet ET, et al. (1985) Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplaquia, an AIDS-associated lesion. *N Eng J Med* 313: 1564-71.

Gern JE, Busse WW. (1995) The effects of rhinovirus infections on allergic airway responses. *Am J Respir Crit Care Med* 152: S40-S45.

Gershon A. (1995) Varicella vaccine: its past, present and future. *Pediatr Infect Dis J* 14: 742-4.

Glaser SL, Ambinder RF, DiGiuseppe JA, Horn-Ross PL, Hsu JL. (1998) Absence of Epstein- Barr virus transcripts in an epidemiological diverse group of breast cancers. *Int J Cancer* 75: 555-558.

Gompel UA, Nicholas J, Lawrence G et al. (1995) The DNA sequence of human Herpesvirus 6: structure, coding content and genome evolution. *Virology* 209: 29

Grasser FA, Murray P, Kremmer E, Klein K et al. (1994) Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr Virus- encoded Nuclear Antigen 1 (EBNA 1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's Disease. *Blood* 84: 3792-3798.

Grundhoff A, Ganem D. (2004) Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. *J Clin Invest* 113: 124-136.

Gross L. (2005) Virus proteins prevent cell suicide long enough to establish latent infection. http://en.wikipedia.org/wiki/Epstein-Barr_virus (15.10.2007).

Greenberg DA, Aminoff MJ, Simon RP. eds (2002) *Clinical Neurology*. 3rd Edition, Mcgraw-Hill: New York.

Gutierrez J et al. (1997) Epstein-Barr Virus and Oral Squamous Epithelial Proliferative Lesions. *Proceedings of ICAAC, American Society for Microbiology, Toronto*.

Haddeland U, Karstensen A, Farkas L, Bo K, Pirhonem J, Karlsson M, Kvavik W, Brandtzaeg P, Nakstad B. (2005) Putative regulatory T cells are impaired in cord blood from neonate with hereditary allergy risk. *Pediatr Allergy Immunol* 16: 104-112

Haque T, Wilkie GM, Taylor C, Amlot PL, Murad P, Iley A et al. (2002) Treatment of Epstein-Barr virus positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet* 360 (9331): 436-42.

Hardwicks J. 1997. Viral inhibitors of apoptosis. *Proceedings of ICAAC, American Society for Microbiology, Toronto*.

Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Britt WJ, Bland KI, Cobbs CS. (2002) Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet* 360: 1557-1563.

Hartwell LH, Hunt RT, Nurse P. (2001) Key regulators of the cell cycle. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/press.html. (10.01.2008).

Hegele RG, Hayashi S, Hogg JC, Pare PD. (1995) Mechanisms of airway narrowing and hyperresponsiveness in viral respiratory tract infections. *Am J Respir Crit Care Med* 151(5): 1664-5.

Henderson S, Rowe M, Gregory C et al. (1991) Induction of bcl-2 expression by EBV Latent Membrane Protein-1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65: 1107-1115.

Henke-Gendo C, Schulz TF, Hoepfer MM. (2004) HHV-8 in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 350(2): 194-5.

Henle G, Henle W, Diehl V. (1968) Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 59: 94-101.

Herbst H, Foss HD, Samol J, Araujo I, Klotzbach H et al. (1996) Frequent expression of Interleukin 10 by Epstein-Barr Virus harboring tumor-cells of Hodgkin's Disease. *Blood* 87(7): 2918-29.

Hermine O, Lefrère, Bronowicki JP et al. (2002) Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 89-94.

Hermouet S, Sutton CA, Rose TM, Greenblatt RJ, Corre I, Garand R, Neves AM, Bataille R, Casey JW. (2003) Qualitative and quantitative analysis of human Herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. *Leukemia* 17: 185-195.

Hermouet S, Corre I, Gassin M, Bigot- Corbel E, Sutton CA, Casey JW. (2003) Hepatitis C Virus, Human Herpesvirus 8, and the development of plasma-cell leukemia. *N Eng J Med* 348: 178-179.

Herpes simplex virus.
http://en.wikipedia.org/wiki/Herpes_simplex_virus (10.01.2008).

Higuchi M, Hata T, Furuya S. (2005) Cerebral Lymphoma in an adenosine deaminase-deficient patient with severe combined immunodeficiency receiving polyethylene glycol-conjugated adenosine deaminase. *Pediatrics* 116: 876-9.

Hill JM, Gebhardt BM, Azcui AM, Mathews KE, Lukiw WJ, Steiner I, Thompson HW, Ball MJ. (2005) Can a Herpes Simplex Virus type 1 neuroinvasive score be correlated to other risk factors in Alzheimer's disease? *Med Hypothesis* 64: 320-7.

Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K. (2003) Characteristics of Hodgkins's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Eng J Med* 349: 1324-32.

Hogg J. (1995) Epstein-Barr Virus and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* 50: 1232.

Horwitz C, Henle W, Henle G. (1981) Clinical and laboratory evaluation of infants and children with EBV induced Infectious Mononucleosis: Report of 32 patients (aged 10 months-48 months). *Blood* 57: 933-38.

Huang L, Chao S, Hwang J. (2004) Human Papilomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma. *Cancer* 100: 327-34.

IARC. (1997) Epstein-Barr virus and Kaposi sarcoma Herpesvirus/ Herpesvirus 8. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, France. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 70: 1-492.

Irons RD, Tuan Le A. (2008) Dithiocarbamates and viral IL-10 collaborate in the immortalization and evasion of immune response in EBV-infected human B lymphocytes. *Chem Biol Interact.* 172 (1): 81-92.

Irving WL, Ratnamohan VM, Hueston LC, Chapman JR, Cunningham AL. (1990) Dual antibody rises to Cytomegalovirus and Herpesvirus 6: frequency of occurrence in CMV infections and evidence for genuine reactivity of both viruses. *J Infect Dis* 161: 910-16.

Jones JF, Shurin S, Abramowsky C et al. (1988) T-cell lymphomas containing Epstein-Barr virus DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Eng Med J*; 318: 733-41.

Jones K, Rivera C, Sgadari C, Franklin J, Max EE, Bathia K, Tosato G. (1995) Infection of human endothelial cells with Epstein-Barr Virus. *J Exp Med* 182(5): 1213-21.

Kanai K, Satoh Y, Yamanaka H, Kawaguchi A, Horie K et al. (2007) The vIL-10 gene of the Epstein-Barr virus (EBV) is conserved in a stable manner except for a few point mutations in various EBV isolates. *Virus Genes* 35(3):563-9.

Kamyama H, Kurosaki K, Kurimoto M et al. (2004) Herpes Simplex Virus-induced, death receptor-dependent apoptosis and regression of transplanted human cancers. *Cancer Sci* 95: 990-98.

Kawada J, Kimura H, Hara S, Ito Y, Kawashima H, Okuno T, Morishima T. (2003) Absence of associations between influenza-associated encephalopathy and Herpesvirus 6 or Herpesvirus 7. *Ped Infect Dis J* 22: 115-19.

Kerr JFR, Harmon BV. (1991) Definition and incidence of apoptosis: a historical perspective. In: *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death* (Tomei LD, Cope FO, eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 5- 29.

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. (1994) Apoptosis - its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-26.

Kim LH, Nadarajah VS, Peh SC, Poppema S. (2004) Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-barr virus in the regulation of cell

growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. *Histopathol* 44(3): 257-67.

Kimberlin DW. (1998) Human Herpesvirus 6 and 7: identification of newly recognized viral pathogens and their association with human disease. *Pediatr Infect Dis J* 17:59-68.

Kinlen LJ, Balkwill A. (2001) Infective cause of childhood leukemia and wartime population mixing in Orkney and Shetland, UK. *Lancet* 357: 858.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH. (2001) The expanding spectrum of Herpesvirus infection of the nervous system. *Brain Pathol* 11(4): 440-51.

Knox KK, Pietryga D, Harrington DJ, Franciosi R, Carrigan DR. (1995) Progressive immunodeficiency and fatal pneumonitis associated with Human Herpesvirus 6 infection in an infant. *Clin Infect Dis* 20: 406- 13.

Kralowics R, Passamonti F, Buser AS, Teo Soon-Siong, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. (2005) A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *New Eng J Med* 352: 1779-90.

Krieger N, Strong EF, Makosky C, Weuve J. (2003) Breast cancer, birth cohorts and Epstein-Barr virus: Methodological issues in exploring the "Hygiene Hypothesis" in relation to breast cancer, Hodgkin disease and stomach cancer. *Cancer Res* 63: 405-411.

Kumar V, Cotran R, Robbins S. (eds) (1997) *Basic Pathology*. W.B. Saunders Company: Philadelphia.

Kurzrock R, Talpaz M. (eds) (1999) *Molecular biology in cancer medicine*. 1st Edition, Martin Dunitz: London.

Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE. (1995) Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res* 55: 39-45.

Lan K, Kuppers DA, Verma SC, Sharma N, Murakami M, Robertson ES. (2005) Induction of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus latency-

associated nuclear antigen by the lytic transactivator RTA: a novel mechanism for establishment of latency. *J Virol* 79: 7453-65.

Lau SK, ChenYY, Chen WG, Diamond DJ, Mamelak AN, Zaia JA, Weiss LM. (2005) Lack of association of Cytomegalovirus with human brain tumors. *Mod Pathol* 18:838-43.

Leach CT, Pollock BH, McClain KL, Parmley RT, Murphy SB, Jenson HB. (2002) Human Herpesvirus 6 and Cytomegalovirus infection in children with Human Immuno Deficiency Virus infection and cancer. *Ped Infec Dis J* 21: 125-32.

Lee ES, Locker J, Nalesnik M. (1995) The association of Epstein- Barr virus with smooth-muscle tumours occurring after organ transplantation. *N Engl J Med* 332: 19-25.

Lennet ET, Blackbourne DJ, Levy JA. (1996) Antibodies to HHV type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 348: 858-861.

Lin JC, Wang WY, Chen KY, Wei YH, Liang WM, Jan JS, Jiang RS. (2004) Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. *N Eng J Med* 350: 2461-70.

Linde A, Fridell E, Dahl H, Andersson J, Biberfeld P, Wahren B. (1990) Effect of primary Epstein-Barr Virus infection on Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus and Measles virus immunoglobulin G titers. *J Clin Microbiol* 28: 211-15.

Lockey T, Manspeaker M et al. (1997) Presentation of lytic and latent proteins using a recombinant vaccinia virus in an EBV vaccine. *Proceedings of ICAAC, American Society for Microbiology, Toronto.*

Long HM, Haigh TA, Gudgeon NH. (2005) CD4+ T-cell responses to Epstein-barr Virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 79(8): 4896-907.

Louis D, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 114(2): 97-109.

Lucas K, Small T, Heller G, Dupont B, O'Reilly J. (1996) The development of cellular immunity to Epstein-Barr Virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 87: 2594-2603.

Luo MH, Fortunato EA. (2007) Long-term infection and shedding of Human Cytomegalovirus in T98G glioblastoma cells. *J Virol* 81: 10424-36.

Luppi M, Barozzi P, Mariorana A et al. (1994) Human Herpesvirus 6 in normal human brain tissue. *J Infect Dis* 169: 943-5.

Marina (2008) Encephalitis image.
http://en.wikipedia.org/wiki/Herpes_simplex_virus (10.01.2008).

Mackenzie J, Gallagher A, Clayton RA, Perry J, Eden OB, Ford AM, Greaves MF, Jarret RF. (2001) Screening for Herpesvirus Genome in common acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 15 : 415-421.

Macswen KF, Crawford DH. (2003) Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis* 3: 131-140.

Marques A, Castro (Neves) AM, Pinheiro M, Mota L, Valente P, Pita Groz. (1993) Porque motivo se internam crianças com varicela? *Rev Port Doenças Inf* 3: 159-64.

Marshall N, Vickers M, BarKer R. (2003) Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV Latent Membrane Protein 1. *J Immunol* 170: 6183-189.

Marshall NA, Culligan D, Tighe J, Jonhston P, Barker R, Vickers M. (2007) The relationships between Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and T regulatory cells in Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol* 35: 596-604.

Martin SJ, Green DR. (1995) Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 18: 137-53.

Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Morgan WJ and the Group Health Associates. (1995) Asthma and Wheezing in the First Six Years of Life. *N Engl J Med* 332: 133-8.

Martini F, Iacheri L, Lazzarin L, Carinci P, Corallini A, Gerosa M, Iuzzolino P, Barbanti-Brodano G, Tognon M. (1996) SV40 early region and large antigen in human brain tumors, peripheral blood cells, and sperm fluids from healthy individuals. *Cancer Res* 56: 4820-4825.

Matsuoka M. (2003) Human T-cell Leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Oncogene* 22: 5131-5140.

McClain KL, Leach CT, Jenson HB, et al. (1995) Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. *N Engl J Med* 332: 12-18.

Medeiros MG, Rodrigues AS, Batoréu MC, Laires A, Rueff J, Zhitkovich A. (2003) Elevated levels of DNA- protein crosslinks and micronuclei in peripheral lymphocytes of tannery workers exposed to trivalent chromium. *Mutagenesis* 18: 19-24.

Moghadam A, Rosenzweig M, Lee-Parritz D, Annis B, Johnson RP, Wang F. (1997) An animal model for acute and persistent Epstein- Barr virus infection. *Science* 276: 2030-3.

Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Van Overtvelt L. (2006) Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 61: 151-165.

Moore P, Chang Y. (1995) Detection of Herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma lesions from persons with and without HIV infection. *N Engl J Med* 332: 1181-1185.

Moore PS, Gao SJ, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles DM, Garber R, Pellet PE, McGeoch DJ, Chang Y. (1996) Primary characterization of a Herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol* 70: 549-558.

Muñoz-Marmol AM, Mola G, Ruiz Larroya T, Fernandez-Vasalo A, Vela E, Mate JL, Ariza A. (2006) Rarity of JC virus DNA sequences and early proteins in human gliomas and medulloblastomas: the controversial role of JC virus in human neurooncogenesis. *Neuropath App Neurobiol* 32: 131-140.

Myashita EM, Yang B, Lam KM, Crawford DH, Thorley-Lawson DA. (1995) A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B-cells in vivo. *Cell* 80: 593-601.

Najjar I, Baran-Marszak F, Le Clorennec C et al. (2005) Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF- κ B-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* 79(8): 4936-43.

Nanbo A, Inoue K, Adachi-Takasawa K, Takada K. (2002) Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J*; 21: 954-965.

Nemerow G, Mold C, Keivens-Schwend V et al. (1987) Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of EBV to the EBV/C3d receptor of B Cells sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 61: 79-84.

Neves AM, Hermouet S, Rueff J, Caetano JM, Thompson G, Casey JW. (2005) Immunobiological mechanisms induced by DNA virus (abstract). *Proceedings of the V Rencontre Scientifique du Cembreu, Briançon*.

Neves AM. (2007). Mononucleose Infecciosa (MNI). *Um Agente Infiltrado. Respirar* 5: 5-8.

Ohashi Y, Minegishi M, Fujie H, Tsuchiya S, Ischinohazama R, Konno T. (1996) Mutations of the Epstein-Barr Virus LMP-1 oncogene in a 10-year-old Japanese girl with nasopharyngeal carcinoma. *Acta Pediatr* 85: 1376-9.

Okamoto H, Mineta T, Ueda S, Nakahara Y, Shiraishi T, Tamiya T, Tabuchi K. (2005) Detection of JC virus in brain tumors in pediatric patients J Neurosurg 102: 294-8.

Oliveira E. (2007) DNA virus in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis Cancer Lett 18; 247(2):182-96.

Osterholm M. (2000) Emerging infections- Another warning. N Engl J Med 342: 1280-1281.

Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N, Roizman B. (2004) Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. Semin Cancer Biol 14: 453-71.

Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe et al. (1991) Expression of Epstein-Barr (EBV) latent gene products in tumor cells of Hodgkin's Disease. Lancet 337: 320-322.

Papadopoulos NG, Xepapadaki P, Mallia P, Brusselle G, Watelet J et al. (2007) Mechanisms of virus-induced asthma exacerbations: state-of-the-art. A GA²Len and InterAirways document. Allergy 62: 457-470.

Paul JR, Bunnell WW. (1932) The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. Am J Med Sci 183:90.

Podolsky DK, Gonzalez RG, Hasserjian RP. (2006) A 71-year-old woman with Crohn disease and altered mental status. N Eng J Med 354: 1178-84

Poltermann S, Schiehofer B, Steindorf K, Schnitzler P, Geletneky K, Schlehofer JR. (2006) Lack of association of Herpesvirus with brain tumors. J Neurovirol 12(2): 90-99.

Prévo S, Nérès J, de Saint Maur PP. (1994) Detection of Epstein-Barr virus in an hepatic neoplasm in an adult human immunodeficiency virus 1-infected patient. Virchows Arch 425: 321-25.

Prober C. (2005) Sixth Disease and the ubiquity of Human Herpesvirus. *New Eng J Med* 352: 753-55.

Quackenbush SL, Work TM, Balazs GH, Casey RN, Rovnak J, Chaves A, duToit L, Baines ID, Parrish CR, Bowser PR, Casey JW. (1998) Three closely related Herpesvirus are closely associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology* 246: 392- 399.

Revillard JP. (ed) (1995) *Immunologie*. 2nd edition, De Boeck Larcier: Bruxelles.

Ribalta T, Martinez AJ, Jares P, Muntane J, Miquel R, Claramonte X, Cardesa A. (2002) Presence of occult Cytomegalovirus infection in the brain after orthotopic liver transplantation. An autopsy study of 83 cases. *Virchows Arch* 440: 166-71.

Richard D, Whitley R, Hayden F. (eds) (1997) *Clinical Virology*. 1st edition, Churchill Livingstone: New York.

Romagnani S. (2006) Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy* 61: 13-14.

Rooney C, Smith C, Ng C et al. (1995) Use of gene modified virus-specific T-lymphocytes to control Epstein-Barr virus related lymphoproliferation. *Lancet* 345: 9-13.

Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S. (1998) Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res* 26: 1628-1635.

Rose TM, Strand KB, Schultz ER, Schaefer G, Rankin GW, Thouless ME, Tsai CC, Bosch ML. (1997) Identification of two homologs of the Kaposi's sarcoma- associated Herpesvirus/ human Herpesvirus-8 in retroperitoneal fibromatosis of different macaque species. *J Virol* 71: 4138-4144.

Rossi G, Bonetti F. (2004) EBV and Burkitt's lymphoma. *N Eng J Med* 350: 1328-1337.

Roitt IM. (ed) (1994) *Essential Immunology*. 8th edition, Blackwell Scientific: Oxford.

Royston I, Sullivan J, Peiman P, Perlin E. (1975) Cell-mediated immunity to Epstein-Barr-virus-transformed lymphoblastoid cells in acute infectious mononucleosis. *N Eng J Med* 293: 1002-5.

Rueff J, Gaspar J, Kranendonk M. (2002) DNA polymorphisms as modulators of genotoxicity and cancer. *Biol Chem* 383: 923-32.

Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Chang Y, Moore PS. (1996) Nucleotide sequence of the Kaposi's sarcoma associated Herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14862-14867.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various auto-immune diseases. *J Immunol* 155: 1151-64.

Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD et al. (1986) Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234:596.

Samanta M, Harkins I, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS. (2003) High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J Urol* 170: 998-1002.

Sanchez-Echaniz J, Mintegui-Raso S, Benito-Fernandez J, Corral-Carracejo JM. (1996) Síndromas Mononucleósicos con serologías doblemente positivas a Vírus de Epstein-Barr y Citomegalovirus. *An Esp Pediatr* 45(3): 242-4.

Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F et al. (2008) The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol* 43 (2): 61-5.

Scheurer ME, El Zein R, Bondy ML, Harkins L, Cobbs CS. (2007) RE: Lack of association of Herpesvirus with brain tumors. *J Neurovirol* 13(1): 85; 86-7.

Steller H. (1995) Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445- 9.

Strik HM, Stoll M, Meyermann R. (2004) Immune cell infiltration of intrinsic and metastatic intracranial tumours. *Anticancer Res.* 24: 37-42.

Snanoudj R, Durrbach A, Leblond V, Caillard S, Hurault De Ligny B, Noel C, Rondeau E, Moulin B, Mamzer-Bruneel MF, Lacroix C, Charpentier B. (2003) Primary brain lymphomas after kidney transplantation: presentation and outcome. *Transplantation* 76: 930-7.

Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals Hatem D, Babinet P, d'Agay MF, Clauvel JP, Raphael M, Degos L, Sigaux F. (1995) Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* 86: 1276-1280.

Sumaya CV, Ench Y. (1985) Epstein-Barr Virus infectious mononucleosis in children. I. Clinical and laboratory findings. *Pediatrics* 75: 1003-1010.

Sumaya CV, Ench Y. (1985) Epstein-Barr Virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics* 75: 1011-1019.

Svedmyr E, Jondal M. (1975) Cytotoxic effector cells specific for B cell lines transformed by EBV are present within patients with infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1622-26.

Swanink CM, Vercoulen JH, Galama JM et al. (1996) Lymphocyte subsets, apoptosis and cytokines in patients with chronic fatigue syndrome. *J Infect Dis* 173: 460-3.

Takahashi Y, Yamada M, Nakamura J et al. (1997) Transmission of Herpesvirus 7 through multigenerational families in the same household. *Ped Inf Dis J* 16(10): 975-78,

Thorley-Lawson DA, Gross A. (2004) Persistence of the Epstein-Barr Virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 350: 13228-37.

Timms JM, Bell A, Flavell JR, Murray PG, Rickinson AB, Traverse-Glehen A, Berger F, Delecluse HJ. (2003) Target cells of Epstein-Barr Virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 361: 192-3.

Todd SC, Tsoukas CD. (1996) Epstein Barr Virus induces proliferation of immature human thymocytes in an IL2-mediated response. *J Immunol* 156: 4217-23.

Trgovcich J, Johnson D, Roizman B. (2002) Cell surface Major Histocompatibility Complex class II proteins are regulated by the products of the Y1 34.5 and U L 41 genes of Herpes Simplex Virus 1. *J Virol* 76: 6974-86.

Tselis A, Jenson HB. (2006) Epstein-Barr virus. 1st Edition, Taylor and Francis: New York.

Van Devanter DR, Warren P, Bennet L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM. (1996) Detection and analysis of diverse herpes viral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiology*; 34: 1666.

Vieira J, O'Hearn P, Kimball L, Chandran B, Corey. (2001) Activation of Kaposi's sarcoma-associated virus (Human Herpesvirus 8) lytic replication by Human Cytomegalovirus. *J Virol* 75: 1378-86.

Voute PA, Kalifa C, Barret A. (eds) (1998) Cancer in children: clinical management. 4th edition, Oxford University Press: New York.

Wang CY, Sugden B. (2004) New viruses shake old paradigms. *J Clin Invest* 113: 21-23.

Wang L, Bu D, Yang, Chen X, Zhu X. (2004) Castleman's tumors and production of autoantibody in paraneoplastic pemphigus. *Lancet* 363: 525-31.

Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. (1989) Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Eng Med J* 320: 502-6.

Weller TH. (1983) Varicella and herpes zoster: changing concepts of the natural history, control and importance of a not so benign virus. *N Eng J M*, 309: 1362, 1434.

Weller TH. (1971) The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. II *N Eng J Med* 285: 267.

White MK, Gordon J, Reiss K, Del Valle L, Croul S, Giordano A, Darbinyan A, Khalili K. (2005) Human polyomaviruses and brain tumors. *Brain Res Rev* 1: 50: 69-85.

White MK, Khalili K. (2004) Polyoma viruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology* 20: 324: 1-16.

Whitley RJ, Roizman B. (2001) Herpes Simplex Virus Infections. *Lancet* 357: 1513-18.

Wikipedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Herpes_simplex_virus (15.10.2007).

Wrensch M, Weinberg A, Wiencke J, Masters H, MiiKe R, Barger G, Lee M. (1997) Does prior infection with varicella-zoster virus influence risk of adult glioma? *Am J Epidemiol* 145: 594-7.

Wrensch M, Weinberg A, Wiencke J, Miike R, Barger G, Kelsey K. (2001) Prevalence of antibodies to four Herpesvirus among adults with glioma and controls. *Am J Epidemiol* 154: 161-5.

Wright DK, Manos MM. (1990) Sample preparation from paraffin-embedded tissue. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis MA, Gelfont DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), Chapter 19, pp. 153-158, Academic Press: San Diego.

Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K et al. (1988) Identification of human Herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1: 1065,

Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA. (1985) A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* 35: 35-43.

Yewdell J, Bennink J. (1997) Immune Responses to Viruses In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG eds *Clinical Virology* New York: Churchill Livingstone 271-305.

Yoshikawa T, Asano Y, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, Goshima F, Nishiyama Y. (2001) Latent infection of Human Herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis. *J Med Virol* 66: 497-505.

Young L, Aliferi C, Hennessey H et al. (1989) Expression of Epstein-Barr Virus Transformation Associated Genes in Tissue of Patients with EBV Lymphoproliferative Disease. *N Eng J Med* 321: 1080.

Zerr DM, Meier AS, Selke SS, Frenkel LM, Huang ML, Wald A, Rhoads MP, Nguy L, Bornemann R, Morrow RA, Corey L (2005) A population-based study of primary Human Herpesvirus 6 infection. *N Eng J Med* 352: 768-76.

Zhang L, Zhang J, Lambert Q, Der CJ, Dell Valle L, Miklossy J, Kalili K, Zhou Y, Pagano JS. (2004) Interferon Regulatory Factor 7 is associated with

Epstein-Barr virus transformed Central Nervous System Lymphoma and has oncogenic properties. J Virol 78 (23): 12987- 12995

Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, Stastny P. (2005) Effect of Human Cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. J Immunol 174: 3.

Zur Hausen H. (2000) Papilloma viruses causing cancer evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 92: 690-698.

Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G et al. (1970) EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature 228: 1056-8.